

Aus dem Institut für Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Validierung differentiell exprimierter microRNAs in
Meningeom-Subtypen und Identifizierung von Zielgenen
der microRNA-34a-3p**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von Tamara Vanessa Werner
geboren am 01.04.1987 in Neunkirchen/Saar

„Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie der
Schwatz mit Kollegen auf dem Flur.“

Arno Penzias, Nobelpreisträger Physik 1978

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Zusammenfassung	1
Summary	2
2. Einleitung	3
2.1 Meningeome	3
2.1.1 Epidemiologie, Klassifikation und Histopathologie von Meningeomen	3
2.1.2 Entstehung und Progression von Meningeomen	5
2.1.3 Deregulierte zelluläre Signalwege in Meningeomen	8
2.2 microRNAs	10
2.2.1 Entdeckung und Geschichte von microRNAs	10
2.2.2 Biogenese von miRNAs und Regulation der Genexpression	11
2.2.3 miRNAs und Karzinogenese	14
2.2.4 miRNAs und Meningeome	16
2.3 Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Chemikalien und Medien	19
3.1.2 Enzyme und Reaktionskits	20
3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
3.1.4 Größenstandards für Agarose- und SDS-Polyacrylamidgele	22
3.1.5 Vektoren	23
3.1.6 DNA-Oligonukleotide und Reportervektor-Konstrukte	25
3.1.7 DNA-Oligonukleotide für die RT-qPCR	28
3.1.8 RNA-Oligonukleotide	28
3.1.9 Primäre und sekundäre Antikörper	29
3.1.10 Patientenmaterial	29
3.1.11 Software, Online-Tools und Datenbanken	30
3.2 RNA-Methoden	32
3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA mittels QIAGEN® miRNeasy Mini Kit	32
3.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	32
3.2.3 Qualitätskontrolle isolierter Gesamt-RNA mittels des Agilent 2100 Bioanalyzer	33
3.3 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription	
(Reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)	34
3.3.1 Reverse Transkription von Gesamt-RNA in cDNA	34
3.3.2 RT-qPCR zur Detektion von miRNAs	35

3.4 Zellbiologische Methoden	36
3.4.1 Kultur und Lagerung eukaryotischer Zellen	36
3.4.2 Zellzählung mittels eines automatischen Zellzählgerätes	37
3.4.3 Transfektion eukaryotischer Zellen	38
3.4.4 Bestimmung der Proliferationsrate	39
3.4.5 Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Apoptose	39
3.5 Molekularbiologische Methoden	41
3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> – PCR)	41
3.5.2 Agarose-Gelelektrophorese	45
3.5.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	45
3.5.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	45
3.5.5 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen	46
3.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten	47
3.5.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA	47
3.6 Mikrobiologische Methoden	48
3.6.1 Kultur und Lagerung von Bakterien	48
3.6.2 Herstellung chemokompetenter <i>Escherichia coli</i> DH5α	49
3.6.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i> DH5α	50
3.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	50
3.7 Dual-Luciferase® Reporter Assay	51
3.8 Proteinbiochemische Methoden	52
3.8.1 Gewinnung von Gesamtprotein-Extrakten aus eukaryotischen Zellen	52
3.8.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein-Extrakten	52
3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
3.8.4 Western-Blot	54
4. Ergebnisse	57
4.1 Isolierung und Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA aus Meningeom-Tumorgewebe	57
4.1.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Meningeom-Tumorgewebe	57
4.1.2 Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA nach Isolation aus Meningeom-Tumorgewebe	58
4.2 Validierung differentiell exprimierter miRNAs in Meningeomen	62
4.2.1 Validierung von Microarray-Ergebnissen mittels RT-qPCR	62
4.2.2 Validierung der RT-qPCR Ergebnisse des ersten Patientenkollektivs in einem unabhängigen Patientenkollektiv	65
4.3 Identifizierung und Validierung von Zielgenen der miR-34a-3p in Meningeomen	67
4.3.1 Suche nach potentiellen Zielgenen für miR-34a-3p <i>in silico</i>	67
4.3.2 Kontrolle der ektopischen Überexpression der miR-34a-3p nach Transfektion von HEK293T Zellen	68
4.3.3 Posttranskriptionelle Regulation von Zielgenen durch miR-34a-3p	70

4.3.4 Regulation der endogenen Proteinmenge von Zielgenen der miR-34a-3p in einer Meningeom-Zelllinie	77
4.4 Auswirkungen der Deregulation der miR-34a-3p auf Meningeomzellen <i>in vitro</i>	81
4.4.1 Veränderung der Zellproliferation durch Deregulation der miR-34a-3p	81
4.4.2 Veränderung der Apoptose durch Deregulation der miR-34a-3p	83
5. Diskussion	86
5.1 Validierung differentiell exprimierter miRNAs in Meningeomen	87
5.2 Identifizierung und Validierung von Zielgenen der miR-34a-3p in Meningeomen	89
5.3 miRNA-Zielgene und ihr Einfluss auf zelluläre Signalwege in Meningeomen	89
5.3.1 Der TGF- β Signalweg und SMAD4	90
5.3.2 Der Wnt/ β -Catenin Signalweg und FRAT1	93
5.3.3 Der Apoptose-Signalweg und BCL2	97
5.3.4 miRNA-Zielgene und die RB/p53 Signalwege	99
5.4 Weitere miRNA-Zielgene mit Einfluss auf Entstehung und Progression von Meningeomen	101
5.5 Kooperative Effekte der miR-34a-3p und miR-34a-5p auf Zielgene	104
5.6 Ausblick	105
6. Literaturverzeichnis	107
7. Anhang	124
8. Publikationen	134
9. Danksagung	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht über Veränderungen auf Proteinebene sowie zytogenetischer Aberrationen in Meningeomen	5
Abbildung 2:	Biogenese humaner miRNAs	12
Abbildung 3:	DNA-Größenstandard	22
Abbildung 4:	Protein-Größenstandard	22
Abbildung 5:	Vektorkarte von pMIR-REPORT™	23
Abbildung 6:	Vektorkarte von pSG5	24
Abbildung 7:	Absorptionsspektren aus Meningeom-Tumorgewebe isolierter Gesamt-RNA gemessen mit dem NanoDrop™ 2000	57
Abbildung 8:	Exemplarisches Gelbild nach Auftrennung isolierter Gesamt-RNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer	59
Abbildung 9:	Exemplarisches Elektropherogramm für zwei Proben aus dem Gelbild in Abbildung 8	60
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der miR-34a-3p	67
Abbildung 11:	RT-qPCR zum Nachweis der ektopischen Überexpression der miR-34a-3p	69
Abbildung 12:	Regulatorische Effekte in der 3'UTR von <i>SMAD4</i> durch miR-34a-3p	71
Abbildung 13:	Regulatorische Effekte in der 3'UTR von <i>FRAT1</i> durch miR-34a-3p	72
Abbildung 14:	Regulatorische Effekte in der 3'UTR von <i>FGF9</i> durch miR-34a-3p	73
Abbildung 15:	Keine regulatorischen Effekte in der <i>FOS</i> und <i>SRC</i> 3'UTR durch miR-34a-3p	74
Abbildung 16:	Regulatorische Effekte in der 3'UTR von <i>BCL2</i> durch miR-34a-3p	76
Abbildung 17:	Veränderung der SMAD4 Proteinmenge durch Deregulation der miR-34a-3p in Meningeomzellen	78
Abbildung 18:	Veränderung der FRAT1 Proteinmenge durch Deregulation der miR-34a-3p in Meningeomzellen	79
Abbildung 19:	Veränderung der BCL2 Proteinmenge durch Deregulation der miR-34a-3p in Meningeomzellen	80
Abbildung 20:	Regulation der Proliferation von Meningeomzellen durch miR-34a-3p	82
Abbildung 21:	Exemplarischer Scatter-Plot der FACS-Analyse zur Detektion apoptotischer Zellen	83
Abbildung 22:	Die Deregulation der miR-34a-3p verändert Apoptose und Nekrose von Meningeomzellen <i>in vitro</i>	85

Abbildung 23:	Mögliche Auswirkungen deregulierter miRNAs auf den TGF- β Signalweg	91
Abbildung 24:	Mögliche Auswirkungen deregulierter miRNAs auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg und seine Zielgene	94
Abbildung 25:	Mögliche Auswirkungen deregulierter miRNAs auf den Apoptose-Signalweg	97
Abbildung 26:	Mögliche Auswirkungen deregulierter miRNAs und der Aberrationen von Chromosom 9p auf die RB/p53 Signalwege	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung der Meningeome nach WHO Grad und histologischen Subtypen	3
Tabelle 2:	PCR-Primer zur Herstellung der Reportervektor-Konstrukte von pMIR-RNL-TK und der Mutagenese von miRNA Bindestellen	26
Tabelle 3:	Übersicht der auf Basis von pMIR-RNL-TK hergestellten Reportervektor-Konstrukte	27
Tabelle 4:	miScript Primer Assays für die RT-qPCR	28
Tabelle 5:	RNA-Oligonukleotide zur Transfektion in der Zellkultur	28
Tabelle 6:	Primär- und Sekundärantikörper	29
Tabelle 7:	Übersicht der Patientenkollektive	30
Tabelle 8:	Pipettierschema der Transfektionsansätze für die Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293T Zellen	38
Tabelle 9:	Pipettierschema der Transfektionsansätze für die Transfektion von RNA-Oligonukleotiden in Ben-Men-1 Zellen	39
Tabelle 10:	Pipettierschema zur Herstellung reduzierender SDS-Polyacrylamidgele	54
Tabelle 11:	Quotienten der Absorptionswerte der Gesamt-RNA für die Proben H2361 und H2426	58
Tabelle 12:	Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels RT-qPCR (Histologische Subtypen)	63
Tabelle 13:	Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels RT-qPCR (WHO Grade)	64
Tabelle 14:	Validierung der RT-qPCR Ergebnisse in einem unabhängigen Patientenkollektiv (Histologische Subtypen)	65
Tabelle 15:	Validierung der RT-qPCR Ergebnisse in einem unabhängigen Patientenkollektiv (WHO Grade)	66
Tabelle 16:	Ausgewählte miRNAs für die Validierung der Microarray-Ergebnisse und ihre chromosomale Lokalisation	87
Tabelle A1:	Detaillierte Übersicht des ersten Patientenkollektivs (Set 1) bestehend aus 55 Meningeompatienten	124
Tabelle A2:	Detaillierte Übersicht des unabhängigen Patientenkollektivs (Set 2) bestehend aus 95 Meningeompatienten	126
Tabelle A3:	RT-qPCR Ergebnisse für das erste Patientenkollektiv (Set 1)	129
Tabelle A4:	RT-qPCR Ergebnisse für das unabhängige Patientenkollektiv (Set 2)	131

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

°C	Grad Celsius
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B-CLL	chronische lymphatische B-Zell Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> - Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Ceanorhabditis elegans</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CMV	Cytomegalie Virus
Cq	<i>cycle threshold</i>
d.h.	das heißt
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> - und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> - fötales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factors</i> - Fibroblasten Wachstumsfaktoren
FSC	<i>forward scatter</i> - Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GTC	Guanidinthiocyanat
h	Stunden
H ₂ O _{dd}	zweifach deionisiertes Wasser
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HPF	<i>High-power-Fields</i>

HRP	<i>horseradish peroxidase</i> - Meerrettich Peroxidase
HSV	Herpes simplex Virus
hTERT	humane reverse Transkriptase der Telomerase
kb	Kilobasen
LB	<i>lysogeny broth</i>
m	milli (10^{-3})
M	Molarität [mol/l]
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i> - multiple Klonierungsstelle
min	Minute(n)
miR	microRNA
miRNA	microRNA
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mut	Mutante
n	nano (10^{-9})
NF2	Neurofibromatose Typ 2
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i> - Ursprung der Plasmidreplikation
p	kurzer Arm eines Chromosoms
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PLB	<i>passive lysis buffer</i> – Passiv-Lysepuffer
pre-miRNA	<i>precursor</i> microRNA
pri-miRNA	<i>primary</i> microRNA
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q	langer Arm eines Chromosoms
qPCR	<i>quantitative real-time PCR</i> - quantitative Echtzeit PCR
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RLU	<i>Relative Luciferase Units</i> - Relative Luciferase Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> - Umdrehungen pro Minute

rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Reverse transcription qPCR</i> – qPCR mit reverser Transkription
SD	<i>standard deviation</i> - Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SEM	<i>standard error of the mean</i> - Standardfehler des Mittelwertes
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SSC	<i>side scatter</i> - Seitwärtsstreulicht
SV40	<i>simian virus 40</i>
TAE	<i>Tris acetate EDTA</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TfB	<i>transformation buffer</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> - Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i> - untranslatierte Region
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> - Volumenprozent
vs.	<i>versus</i> - gegen
w/v	<i>weight per volume</i> - Gewichtsprozent
WB	Western-Blot
WHO	<i>world health organization</i> - Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
α	anti
μ	mikro (10 ⁻⁶)

Abkürzungen für Gene oder Proteine

ACVR2A	activin A receptor type 2A
AK3	adenylate kinase 3
Akt/PKB	AKT serine/threonine kinase
ALK5	transforming growth factor beta receptor 1
ALK7	activin A receptor type 1C
Apaf-1	apoptotic peptidase activating factor 1
APC	adenomatous polyposis coli
BAK1	BCL2 antagonist/killer 1
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator
BBC3	BCL2 binding component 3
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2L2	BCL2-like 2
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6
BRCA1	breast cancer 1
BRCA2	breast cancer 2
c-MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CCND1	Cyclin D1
CDH1	cadherin 1
CDK4	cyclin-dependent kinase 4
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	cyclin dependent kinase inhibitor 2B
CTNNB1	β -Catenin
Cyto C	Cytochrom C
DAL-1	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3
DGCR8	Di-George syndrome critical region gene 8
DIO3	deiodinase, iodothyronine, type III
DLK1	delta like non-canonical Notch ligand 1
DNM2	dynammin 2
Drosha	drosha ribonuclease III
E2F3	E2F transcription factor 3
EGF	epidermal growth factor
ERG2	early growth response 2
FASN	fatty acid synthase
FGF9	fibroblast growth factor 9
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit

FRAT1	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1
GRB2	growth factor receptor bound protein 2
GSK-3 β	glykogen synthase kinase 3 β
HDGF	hepatoma-derived growth factor
HIF-1	hypoxia inducible factor 1
IGF1R	insulin like growth factor 1 receptor
JNK	mitogen-activated protein kinase 8
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
let-7	ncRNA (<i>C. elegans</i>)
lin-14	protein lin-14 (<i>C. elegans</i>)
lin-4	ncRNA (<i>C. elegans</i>)
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBD1	methyl-CpG binding domain protein 1
MDM2	murine double minute 2 protein
MEG3	maternally expressed 3 (non-protein coding)
MEG8	maternally expressed 8 (non-protein coding)
NDRG2	NDRG family member 2
NF2	neurofibromin 2
NMHCIIb	non-muscle heavy chain IIb
NR6A1	nuclear receptor subfamily 6 group A member 1
p14 ^{ARF}	cyclin dependent kinase inhibitor 2A, alternate open reading frame variant
p15	CDKN2B
p16	CDKN2A
p53	protein 53
PDCD4	Programmed cell death-4
PDGF	platelet-derived growth factor
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	phosphatase und tensin homolog
Rb1	retinoblastoma 1
RISC	RNA-incuded silencing complex
RPS6KB1	ribosomal protein S6 kinase B1
RTL1	retrotransposon-like 1
SCUBE3	signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 3
SLIT2	slit guidance ligand 2
SMAD2	SMAD family member 2
SMAD3	SMAD family member 3

SMAD4	SMAD family member 4
SP4	Sp4 transcription factor
SPTBN1	spectrin beta, non-erythrocytic 1
SRC	SRC proto-oncogene, non receptor tyrosine kinase
TCF	T-cell factor
TGF- β	transforming growth factor β
TGF α	transforming growth factor alpha
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
TNF	tumor necrosis factor
TRBP	transactivation-responsive RNA-binding protein
UGP2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2
VEGF	vascular endothelial growth factor A
Wnt	wingless
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2

1. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte ein mittels Microarrays erstelltes microRNA(miRNA)-Expressionsprofil von Meningeomen verschiedener WHO Grade und histologischer Subtypen durch RT-qPCR validiert werden.

- Für die Validierung der Microarray-Ergebnisse wurden zwölf miRNAs ausgewählt, deren Deregulation im gleichen Patientenkollektiv mittels RT-qPCR bestätigt werden sollte. Hierbei konnte eine signifikante differentielle Expression von miRNAs zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen der WHO Grad I Meningeome, u.a. für miR-222, -195 und -497, bestätigt werden. Eine signifikante differentielle Expression zwischen Meningeomen verschiedener WHO Grade bestätigte sich u.a. für miR-34a-3p, -136, -376c, -195 und -497.
- Für die Validierung in einem unabhängigen Patientenkollektiv wurden sechs miRNAs für die RT-qPCR ausgewählt. Für fünf der sechs ausgewählten miRNAs (miR-34a-3p, -136, -376c, -195 und -497) konnte eine signifikante differentielle Expression zwischen Meningeomen verschiedener WHO Grade bestätigt werden. Eine signifikante differentielle Expression konnte für miR-497 zwischen meningoethelialen und fibroblastischen Meningeomen und für miR-376c zwischen meningoethelialen und transitionalen Meningeomen bestätigt werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten vorhergesagte Zielgene für miR-34a-3p experimentell mittels Luciferase-Reporterassay und Western-Blot bestätigt werden. Weiterhin sollten die Auswirkungen einer Deregulation der miR-34a-3p auf Meningeomzellen *in vitro* untersucht werden.

- *SMAD4*, *FRAT1* und *BCL2* konnten als Zielgene der miR-34a-3p auf Ebene der mRNA und des Proteins bestätigt werden. Für *FGF9* konnte eine posttranskriptionelle Regulation auf Ebene der mRNA gezeigt werden, *FOS* und *SRC* konnten nicht als mögliche Zielgene der miR-34a-3p bestätigt werden.
- Die Überexpression der miR-34a-3p in der Meningeom-Zelllinie Ben-Men-1 führte zu einem signifikanten Rückgang der Zellproliferation und einer tendenziell erhöhten Apoptose.
- Die Inhibition der miR-34a-3p führte zu einem signifikanten Rückgang der Apoptose in Ben-Men-1 Zellen.

Summary

Validation of differentially expressed microRNAs in meningioma subtypes and identification of target genes for microRNA-34a-3p

The first aim of the study was the validation of a microarray based miRNA expression profile of meningiomas of different WHO grades and histological subtypes using RT-qPCR.

- Twelve miRNAs were selected for validation in the same sample set used for microarray expression profiling. RT-qPCR confirmed a significant differential expression for miRNAs between histological subtypes of WHO grade I meningiomas amongst others for miR-222, -195 and -497. MiR-34a-3p, -136, -376c, -195 and -497 were significantly differential expressed in meningiomas of different WHO grades.
- Six miRNAs were selected for further validation of differential expression in an independent sample set. Five out of these six miRNAs (miR-34a-3p, -136, -376c, -195 and -497) showed significant differential expression between meningiomas of different WHO grades. A significant differential expression was confirmed for miR-497 in meningothelial compared to fibroblastic meningioma and for miR-376c in meningothelial compared to transitional meningioma.

The second aim of the study was the validation of potential target genes for miR-34a-3p using luciferase reporter assays and Western-blotting. Consequences of deregulation of miR-34a-3p were investigated in a meningioma cell line *in vitro*.

- *SMAD4*, *FRAT1* and *BCL2* have been validated as targets for miR-34a-3p on mRNA and protein level. A posttranscriptional regulation of *FGF9* by miR-34a-3p has been confirmed on mRNA level, only. *FOS* and *SRC* could not be validated as potential targets of miR-34a-3p.
- Overexpression of miR-34a-3p in the meningioma cell line Ben-Men-1 reduced proliferation significant and increased apoptosis moderate.
- Inhibition of miR-34a-3p significantly reduced apoptosis in Ben-Men-1 cells.

2. Einleitung

2.1 Meningeome

2.1.1 Epidemiologie, Klassifikation und Histopathologie von Meningeomen

Meningeome gehören mit einem Anteil von etwa 35 % zu den häufigsten Primärtumoren des zentralen Nervensystems [1, 2]. Die jährliche Inzidenz der Neuerkrankungen liegt bei etwa 7 von 100.000 Personen und das Erkrankungsalter am häufigsten im 5. Lebensjahrzehnt, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer. Es handelt sich um zumeist langsam wachsende, gutartige Tumoren die aus den arachnothelialen Deckzellen der Spinnwebshaut (Arachnoidea mater) entstehen. Die Spinnwebshaut bildet die mittlere Schicht der drei Hirnhäute, zu denen noch die äußere Hirnhaut (Dura mater) sowie die innere Hirnhaut (Pia mater) gehören. Da die Hirnhäute auch den Spinalkanal umgeben können Meningeome nicht nur intrakraniell, sondern auch intraspinal lokalisiert sein [1, 2].

Die Meningeome werden von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) in drei Grade klassifiziert, die in insgesamt 15 histologische Subtypen unterteilt werden [3, 4]. In Tabelle 1 ist eine Übersicht der aktuellen Klassifikation zusammengefasst.

Tabelle 1: Einteilung der Meningeome nach WHO Grad und histologischen Subtypen. Die Tumoren werden in drei WHO Grade mit 15 histologischen Subtypen klassifiziert.

WHO Grad	Histologischer Subtyp
I	Meningothelial
	Fibrös (Fibroblastisch)
	Transitional (gemischt)
	Psammomatös
	Angiomatös
	Mikrozystisch
	Sekretorisch
	Lymphoplasmazellreich
	Metaplastisch
II	Atypisch
	Chordoid
	Klarzellig (intrakraniell)
III	Anaplastisch
	Papillär
	Rhabdoid

Etwa 80 % aller Meningeome sind benigne, langsam wachsende Tumoren mit WHO Grad I, welche überwiegend einen meningothelialen, fibroblastischen und transitionalen

histologischen Subtyp aufweisen. Da WHO Grad I Meningeome klar begrenzt und nicht infiltrierend in das umliegende Hirngewebe wachsen, sind sie zumeist sehr gut operabel, und die 5-Jahres-Rezidivrate nach makroskopischer Totalresektion liegt bei 7 - 20 % [5, 6].

WHO Grad II Meningeome haben unter allen Meningeom-Tumoren einen Anteil von 15 - 20 % und sind histologisch meist dem atypischen Subtyp zuzuordnen [5, 6]. Die 5-Jahres-Rezidivrate ist bei diesen Tumoren mit 29 - 40 % deutlich erhöht [7]. Die Klassifizierung eines atypischen Meningeoms basiert auf verschiedenen histomorphologischen Kriterien, hierzu gehören u.a. eine erhöhte Zelldichte, das Vorliegen von Zellen mit veränderter Größenrelation des Kerns zum Zytoplasma, prominente Nukleoli und spontane Nekrosen. Wenn mindestens drei dieser Merkmale vorhanden sind oder die Tumoren zwischen 4 und 19 Mitosen in zehn zusammenhängenden sogenannten „High-power-Fields“ (HPF) aufweisen, so werden sie als atypische Meningeome eingestuft [5, 6].

Meningeome mit WHO Grad III sind maligne Tumoren mit einem Anteil von nur 1 - 3 % aller Meningeome, welche überwiegend dem anaplastischen Subtyp zugeordnet werden können [5, 6]. Klinisch kennzeichnet diese Tumoren ein aggressives Wachstum mit Infiltration umliegender Gewebe. Eine operative Totalresektion ist aus diesem Grund oft nicht möglich und die Rezidivrate ist mit 50 - 80 % sehr hoch. Die mittlere Überlebensrate nach Diagnose beträgt lediglich zwei Jahre [7]. Histologisch zeigen diese Tumoren eine hohe mitotische Aktivität mit mehr als 20 Mitosen pro 10 HPF sowie Bereiche mit ausgeprägten Nekrosen [5, 6].

Die Prognose für die Patienten ist in der Klinik von verschiedenen Faktoren abhängig [8-11]. Sofern möglich werden Meningeome operativ entfernt, der wichtigste Parameter für die Prognose ist die Vollständigkeit der Tumorresektion. Nach unvollständiger Resektion erleidet fast die Hälfte aller Patienten innerhalb der ersten fünf Jahre ein Tumorrezidiv, während dieser Anteil bei Patienten mit makroskopischer Totalresektion unabhängig vom WHO Grad bei 12 % liegt [10, 11]. Patienten über 65 Jahre haben eine schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate und zudem ein höheres Risiko an den Folgen des Tumors zu versterben [9]. Die intrakranielle Lokalisation des Tumors beeinflusst ebenfalls die Prognose. Meningeome der Konvexität weisen häufiger den atypischen oder anaplastischen Subtyp auf oder zytogenetische Veränderungen, die mit der Progression assoziiert sind [8].

2.1.2 Entstehung und Progression von Meningeomen

Zahlreiche Aberrationen auf zytogenetischer Ebene, aber auch veränderte Expression von Proteinen, konnten als Faktoren, die zur Entstehung und Progression von Meningeomen beitragen, identifiziert werden. Mit steigendem Tumorgrad ist vor allem eine Anhäufung verschiedener zytogenetischer Veränderungen von Bedeutung [12]. Abbildung 1 gibt eine Übersicht zu Faktoren, die mit der Entstehung und Progression von Meningeomen assoziiert sind.

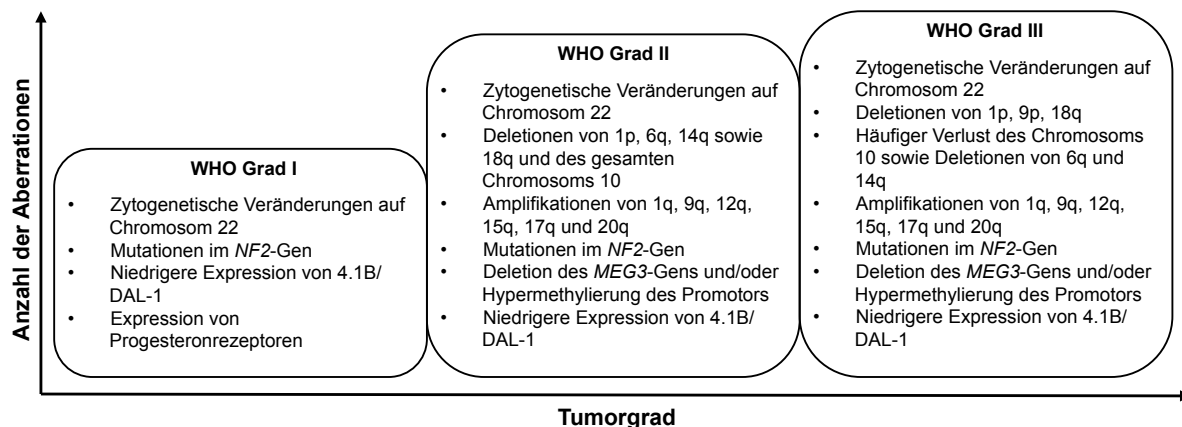


Abbildung 1: Übersicht über Veränderungen auf Proteinebene sowie zytogenetischer Aberrationen in Meningeomen. p: kurzer Arm des Chromosoms; q: langer Arm des Chromosoms; NF2: neurofibromin 2; MEG3: maternally expressed 3 (non-protein coding); DAL-1: erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3

Meningeome waren die ersten soliden Neoplasien, bei denen eine charakteristische zytogenetische Veränderung, die maßgeblich an der Tumorentstehung beteiligt ist, identifiziert werden konnte [5, 13]. Die Monosomie des Chromosoms 22 ist die häufigste molekulargenetische Veränderung in Meningeomen [13]. Erstmals beobachtet wurde dieser Zusammenhang bei Patienten, die von der Erbkrankheit Neurofibromatose Typ 2 betroffen sind. Diese Erbkrankheit wird autosomal dominant vererbt und betroffene Patienten leiden an verschiedenen Tumoren des Nervensystems wie bilateralen Akustikusneurinomen und multiplen Meningeomen [14]. Auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (22q12.2) befindet sich das Tumorsuppressor-Gen *neurofibromin 2* (*NF2*), welches für das Protein Merlin kodiert. Ein Verlust der Heterozygotie in diesem Bereich liegt bei nahezu allen Meningeomen, die mit Neurofibromatose Typ 2 assoziiert sind, sowie bei 54 - 78 % aller sporadisch auftretenden Meningeome vor [15]. Etwa 60 % dieser Tumoren zeigen zusätzlich Mutationen im verbleibenden *NF2* Allel [16, 17]. Die häufigsten Mutationen im kodierenden Bereich für das *NF2*-Gen sind kleine Insertionen, Deletionen oder nonsense Mutationen an Splice-Stellen, die die Prozessierung der kodierten mRNA beeinflussen. Die meisten mit

Meningeomen assoziierten *NF2*-Mutationen resultieren in einem verkürzten, nicht funktionsfähigen Merlin Protein [18].

Bei Meningeomen treten Mutationen im *NF2*-Gen mit ~ 70 % in Tumoren aller WHO Grade insgesamt in etwa gleich häufig auf [19, 20]. Aus diesem Grund sind sie wahrscheinlich eher für die Entstehung des Tumors und nicht für dessen Progression relevant. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Häufigkeit des Auftretens von Mutationen im *NF2*-Gen deutlich zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen der WHO Grad I Meningeome [19, 20]. Fibroblastische und transitionale Meningeome weisen mit etwa 70 - 80 % deutlich häufiger entsprechende Mutationen auf als meningotheliale Meningeome, bei denen nur etwa 25 % aller Tumoren betroffen sind. Die Ursachen der Tumorentstehung scheinen demnach bei den benignen Meningeomen mit überwiegend mesenchymalen Zellen (fibroblastischer Subtyp) andere zu sein, als in Meningeomen mit epithelialen Zellen (meningothelialer Subtyp) [19, 20].

Nach Aufklärung der Rolle von Merlin in der Tumorgenese von Meningeomen begann man weitere strukturell und funktionell verwandte Proteine der Protein 4.1 Familie zu untersuchen. Verschiedene Studien zeigten, dass das Protein 4.1B/DAL-1 (erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3) ein potentieller Tumorsuppressor in Meningeomen sein könnte [21, 22]. Dieses Protein wird vom *DAL1*-Gen auf Chromosom 18p11.32 kodiert und ist ein Regulator von Proliferation und Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von DAL-1 das Wachstum von Meningeomzellen *in vitro* reprimiert [22]. Die Regulation des Wachstums von Meningeomen durch DAL-1 wird u.a. durch die Aktivierung verschiedener zellulärer Signalwege durch JNK (mitogen-activated protein kinase 8) gesteuert. JNK reprimiert u.a. die Expression von Cyclin A. Hierdurch wird das Tumorsuppressor-Protein Rb1 (retinoblastoma 1) hyperphosphoryliert und es kommt zu einem Zellzyklusarrest am Übergang von der G_0 zur G_1 -Phase [21, 22]. Zur Beurteilung, ob DAL-1 eher eine Rolle in der Tumorgenese oder in der Progression von Meningeomen spielt, gibt es widersprüchliche Studien [23-25]. In ersten Studien konnte in 60 % der untersuchten sporadisch auftretenden Meningeome ein Verlust der Heterozygotie von *DAL-1* gezeigt werden und das Protein wurde mit der Tumorgenese assoziiert [23, 24]. In einer anderen Studie wurde eine deutlich niedrigere Frequenz der Inaktivierung von *DAL-1* in sporadisch auftretenden Meningeomen beobachtet und das Protein eher mit der Progression assoziiert [25].

Das *TIMP3*-Gen (tissue inhibitor of metalloproteinase 3) ist auf Chromosom 22q12 lokalisiert und wurde mit der Progression von Meningeomen assoziiert [26]. Eine Hypermethylierung des *TIMP3*-Promotors wurde in 67 % der untersuchten anaplastischen Meningeome beobachtet, während dies nur bei 22 % der atypischen Meningeome und 17 % der benignen Meningeome der Fall war. Die Hypermethylierung von *TIMP3* trat nur in Kombination mit einem Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 22q12 auf und wurde im Gegensatz zu der

Bedeutung der Inaktivierung des *NF2*-Gens in der Tumorgenese nur mit einer Steigerung der Malignität von Meningeomen in Verbindung gebracht [26].

Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) sind nach den Aberrationen von Chromosom 22 die zweithäufigste zytogenetische Veränderung in Meningeomen und treten vor allem bei höhergradigen Tumoren auf [27]. Während bei Meningeomen vom WHO Grad I nur rund 20 % der Tumoren Verluste auf 1p zeigen, sind bei WHO Grad II 40 - 76 % und bei WHO Grad III 70 - 100 % aller Meningeome betroffen [27]. Tumoren mit einer Deletion des Chromosoms 1p weisen unabhängig vom WHO Grad mit 30 % die höchste Rezidivrate auf [28]. Eine Deletion von Chromosom 1p scheint außerdem die Progression zu einem anaplastischen Meningeom zu forcieren [8].

Deletionen des langen Arms von Chromosom 14 (14q) gehören ebenfalls zu den häufigsten zytogenetischen Veränderungen in Meningeomen [27]. Betroffen sind etwa 30 % bei WHO Grad I, 40 - 70 % bei WHO Grad II und fast alle WHO Grad III Meningeome [27, 29]. Auf Chromosom 14q32 befindet sich das Gen *MEG3* (maternally expressed 3 (non-protein coding)), das vom maternalen Allel exprimiert wird [30]. Dieses Gen kodiert für eine nicht Protein-kodierende RNA und ist als Tumorsuppressor in die Pathogenese und Progression von Meningeomen involviert. Mit steigendem Tumorgrad ist *MEG3* in Meningeomen niedriger exprimiert. Ursachen hierfür sind Deletionen im *MEG3* Locus sowie eine Hypermethylierung des Promotors [30]. Ein weiteres auf Chromosom 14q11.2 lokalisiertes Gen ist *NDRG2* (NDRG family member 2), dessen Expression vor allem in WHO Grad III Meningeomen stark reprimiert ist [31]. Eine niedrige Expression zeigen außerdem WHO Grad II Meningeome die sich klinisch als aggressive Tumoren darstellen. Ursache für die stark erniedrigte Expression von *NDRG2* ist ebenfalls eine Hypermethylierung des Promotors [31].

Auf Chromosom 9 konnten mehrere Tumorsuppressor-Gene identifiziert werden, bei denen es durch Deletionen von Teilen dieses Chromosoms zu einer verminderten oder komplett fehlenden Expression kommt [32]. Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 9 (9p) treten mit 38 % hauptsächlich bei anaplastischen Meningeomen mit WHO Grad III auf, während nur 5 % der WHO Grad I und 18 % der WHO Grad II Meningeome betroffen sind. Die Tumorsuppressor-Gene *CDKN2A/p16^{INK4a}* (cyclin dependent kinase inhibitor 2A) und *CDKN2B/p15^{INK4b}* (cyclin dependent kinase inhibitor 2B) sind auf Chromosom 9p21 kodiert. Das Protein p14^{ARF}, eine Transkriptvariante des *CDKN2A*-Gens (*p14^{ARF}* (cyclin dependent kinase inhibitor 2A, alternate open reading frame variant)), reguliert die Apoptose über den p53 Signalweg und die Proteine p15 und p16 sind an der Zellzykluskontrolle am Übergang von der G₁ zur S-Phase beteiligt [32]. Patienten mit einem anaplastischen Meningeom und einer Deletion von Chromosom 9q21 haben signifikant kürzere Überlebenszeiten als Patienten ohne diese Deletion [33].

Da Frauen etwa doppelt so häufig von Meningeomen betroffen sind wie Männer, wurde in verschiedenen Studien der Einfluss von Sexualhormonen auf das Wachstum der Tumoren untersucht [34]. Ein verstärktes Tumorwachstum wurde während der Schwangerschaft und der lutealen Phase des Menstruationszyklus beobachtet [35]. In diesen Zeiträumen kommt es zu einer verstärkten Ausschüttung von Progesteron [35]. Außerdem ist die Inzidenz von Meningeomen bei Brustkrebspatientinnen erhöht [36]. Hormonrezeptoren werden von 50 - 80 % der benignen WHO Grad I Meningeome exprimiert, überwiegend Progesteronrezeptoren, aber auch Östrogen- und Androgenrezeptoren [37]. Eine erhöhte Expression von Progesteronrezeptoren führt zu einem Rückgang der Apoptose und zum früheren Auftreten von Tumorrezidiven [37].

2.1.3 Deregulierte zelluläre Signalwege in Meningeomen

Die Deregulation verschiedener zellulärer Signalwege steht in einem engen Zusammenhang mit der Entstehung und Progression zahlreicher Tumoren [38]. Diese Zusammenhänge wurden auch für Meningeome untersucht [39, 40]. Bei einigen Signalwegen konnte deren Deregulation mit vorhandenen zytogenetischen Aberrationen in Verbindung gebracht werden, bei anderen Signalwegen sind die Ursachen der Deregulation noch weitgehend unbekannt. Zu den in Meningeomen am häufigsten von einer Deregulation betroffenen Signalwegen gehören RB/p53, Wnt (wingless)/ β -Catenin, TGF- β (transforming growth factor β), MAPK (Mitogen-activated protein kinase) und PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt (AKT serine/threonine kinase), die im Folgenden einzeln näher erläutert werden [39, 40].

Die RB/p53 Signalwege

Das Tumorsuppressor-Protein Rb1 (retinoblastoma 1) spielt eine zentrale Rolle in der Inhibition des Zellzyklus am Übergang von der G₁ zur S-Phase [39]. Rb1 bindet und inhibiert Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Aktiviertes Cyclin D bindet an CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) und CDK6 (cyclin-dependent kinase 6) und dies führt zur Phosphorylierung von Rb1. Diese Phosphorylierung aktiviert Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und damit die Transkription von Genen, die entscheidend für den Übergang von der G₁ zur S-Phase des Zellzyklus sind. Die Tumorsuppressoren CDKN2A/p16^{INK4a} und CDKN2B/p15^{INK4b} verhindern den Eintritt in die S-Phase durch Inhibition des CDK4/Cyclin D Komplexes. Eine übermäßige Aktivierung des Zellzyklus durch den RB Signalweg wird durch ein negatives Feedback des p53 Signalweges unterbunden. Der RB und p53 Signalweg stehen über den Tumorsuppressor p14^{ARF} in Verbindung. Dieser aktiviert p53 durch Inhibition des p53 Suppressors MDM2 (murine double minute 2 protein) [39]. Die Deregulation dieses Signalweges in höhergradigen Meningeomen ist eine Konsequenz von Deletionen auf

Chromosom 9p, die, wie zuvor beschrieben, zu einem Funktionsverlust der kodierten Tumorsuppressoren führen [32]. Zusätzlich gibt es Studien, nach denen auch die verringerte Expression von *RB* und *MEG3* bedingt durch eine Hypermethylierung ihrer Promotoren sowie die Überexpression von MDM2 zu einer Deregulation dieses mit dem Zellzyklus assoziierten Signalweges und damit zur Progression von Meningeomen beitragen [12, 30, 41].

Die MAPK und PI3K/Akt Signalwege

Der MAPK und der PI3K/Akt Signalweg spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose, die zur Pathogenese von Meningeomen beitragen [39].

Die Aktivierung des PI3K Signalweges führt zur Aktivierung von PKB/Akt und p70^{S6K} (RPS6KB1, ribosomal protein S6 kinase B1). Diese Proteine sind Schlüsselkomponenten des wachstumsfördernden Effekts dieses Signalweges [42]. Mutationen von Akt, die zu einer übermäßigen Aktivierung des Signalweges führen, wurden in Meningeomen gefunden [42]. Die Stimulation durch verschiedene Wachstumsfaktoren führt in Meningeomen zu einer Aktivierung der MAPK und Akt/PKB Signalwege. Durch Inhibition von MAPK und PI3K konnte gezeigt werden, dass die erniedrigte Phosphorylierung von MAPK, Akt und p70^{S6K} die Proliferation in Meningeomen inhibiert [42, 43]. Es wurde außerdem gezeigt, dass die übermäßige Aktivierung von PI3K/Akt zu unkontrollierter Proliferation von malignen Meningeomen führt während der MAPK Signalweg sowohl in die Regulation der Proliferation als auch der Apoptose in diesen Tumoren involviert ist [44].

Der Wnt/β-Catenin Signalweg

Die Deregulation verschiedener Komponenten des Wnt/β-Catenin Signalweges trägt zur Progression von Meningeomen bei [45, 46]. Etwa ein Drittel aller Meningeome zeigt einen Verlust der Heterozygotie des *CDH1*-Gens (cadherin 1) das für E-Cadherin kodiert. E-Cadherin ist Interaktionspartner von β-Catenin und wichtige Komponente in der Zell – Zell Adhäsion. Die Expression von E-Cadherin ist mit steigendem Tumorgrad erniedrigt, etwa 40 % der WHO Grad I Tumoren sowie 60 - 80 % aller WHO Grad II und III Tumoren zeigen eine deutlich erniedrigte Proteinexpression. Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression von β-Catenin mit steigendem Tumorgrad erhöht ist. Etwa 60 % der anaplastischen WHO Grad III Meningeome haben eine erhöhte Expression von β-Catenin, vor allem im Zellkern. Durch fehlendes E-Cadherin erhöht sich die Menge an freiem intrazellulärem β-Catenin, es kommt zur verstärkten Translokation zum sowie in den Zellkern und zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen [45, 46].

Eine weitere Studie hat gezeigt, dass das Tumorsuppressor-Protein Merlin den Wnt/ β -Catenin Signalweg inhibiert und die Bindung von β -Catenin und N-Cadherin an die Plasmamembran der Zelle aufrecht erhält [47]. Der Verlust der Heterozygotie von Chromosom 22 in Kombination mit Mutationen in der verbleibenden *NF2*-Genkopie führen zum Funktionsverlust von Merlin [18]. Dies führt zur Aktivierung des Signalweges, verstärkter Translokation von β -Catenin in den Zellkern und Aktivierung von Zielgenen wie c-MYC (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) und Cyclin D1 [47]. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint der Wnt/ β -Catenin Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Progression von Meningeomen zu spielen.

Eng mit dem Wnt/ β -Catenin Signalweg verknüpft ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Diese ist ein wichtiger Vorgang bei der Entstehung und Progression verschiedener Tumoren [48]. Eine erniedrigte Expression von E-Cadherin sowie die Translokation von β -Catenin in den Zellkern sind zwei wichtige Ereignisse, die EMT induzieren [49, 50]. Da diese beiden Vorgänge auch bei Meningeomen beobachtet wurden geht man davon aus, dass EMT auch eine Rolle bei der Entstehung und Progression dieser Tumoren spielt [51].

Der TGF- β Signalweg

TGF- β (transforming growth factor β) ist bei der Differenzierung von Zellen, der Zellteilung sowie der Apoptose von Bedeutung [52]. Das TGF- β Signal wird nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor u.a. über die SMAD Proteine in den Zellkern übertragen. Nach Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 bilden diese einen Komplex mit SMAD4, werden in den Zellkern transportiert und es kommt zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen [52]. In Abhängigkeit des Liganden und dem Status der Zelle kann TGF- β die Proliferation epithelialer Zellen in frühen Stadien der Tumorentstehung reprimieren [53], wie dies auch für benigne Meningeome gezeigt wurde [54]. In späteren Tumorstadien kann TGF- β die Proliferation mesenchymaler Zellen sowie Metastasen fördern [53].

2.2 microRNAs

2.2.1 Entdeckung und Geschichte von microRNAs

Im Jahr 1993 wurden die ersten von einem Gen kodierten kleinen RNA-Moleküle im Nematoden *Ceanorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt [55]. Die Regulation des lin-14 Proteins erwies sich als essentiell für die Entwicklung des Nematoden und die Regulation dieses Proteins zeigte eine Abhängigkeit von der Transkription des lin-4 Gens. Das lin-4 Gen kodierte jedoch nicht für ein Protein, sondern für zwei kleine RNAs mit einer Länge von 22 und 61 Nukleotiden. Die Sequenz der längeren RNA bildete eine Stem-Loop Struktur, die als

Vorläufer für die kürzere RNA zu fungieren schien [55]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass diese kleine RNA Komplementarität zu mehreren Sequenzen in der 3' untranslated region (3'UTR) der lin-14 mRNA besitzt [56]. Die Bindung verschiedener kleiner lin-4 RNAs an die komplementären Sequenzen in der 3'UTR der lin-14 mRNA führten zur Hemmung der Translation von lin-14 und beeinflussten so die Regulation der Entwicklung des Nematoden [55, 56]. Im Jahr 2000 wurde eine weitere kleine RNA entdeckt [57, 58]. Die 21 Nukleotide lange let-7 RNA reguliert die Expression von lin-41. Das von diesem Gen kodierte Protein beeinflusst ebenfalls die Entwicklung von *C. elegans* [57, 58]. Die RNA von let-7 wurde kurze Zeit später auch in zahlreichen anderen Organismen, einschließlich des Menschen, gefunden [59].

Die Bezeichnung microRNA (miRNA) für diese kleinen RNAs wurde erstmals im Jahr 2001 verwendet [60]. Noch im gleichen Jahr wurden von mehreren Arbeitsgruppen zahlreiche neue miRNAs entdeckt, die man ursprünglich für endogene dsRNA-Moleküle hielt, die an der Degradation von mRNA beteiligt sind [61-63]. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche miRNAs in verschiedenen Organismen nachgewiesen, darunter Vertebraten, Nematoden, Insekten und Pflanzen [64]. Diese Studien haben außerdem gezeigt, dass miRNA-Sequenzen sowohl zwischen eng als auch weit verwandten Arten hoch konserviert sind [65]. In einzelligen eukaryotischen Organismen wie der Hefe wurden keine miRNA-Gene gefunden. Man geht davon aus, dass das Auftreten von miRNA-Genen in Pflanzen und Vertebraten in engem Zusammenhang mit der Bedeutung von miRNAs in der Zelldifferenzierung und Festlegung von Entwicklungsmustern steht [65]. Aufgrund der großen Anzahl neu entdeckter miRNAs wurde wenig später der Begriff miRNA genauer definiert. Nach aktueller Definition sind miRNAs ~ 22 Nukleotide lange, nicht-kodierende RNAs, die sequenzspezifisch die Expression ihrer Zielgene regulieren [66]. Im Jahr 2002 startete eine Online-Datenbank für miRNAs, die sogenannte miRBase, in der alle Daten zu potentiellen miRNA-Sequenzen, Nomenklatur und Kommentare zusammengefasst sind [67-69]. Die aktuelle Version 21 der miRBase-Datenbank enthält 28645 Einträge für miRNA-Vorläufersequenzen die für 35828 reife miRNAs in 223 verschiedenen Spezies kodieren. Der Anteil humaner Sequenzen umfasst dabei derzeit 1881 miRNA-Vorläufersequenzen und 2588 reife miRNAs.

2.2.2 Biogenese von miRNAs und Regulation der Genexpression

Insgesamt kodieren etwa 3 % des menschlichen Genoms für miRNAs und die kodierenden miRNA-Gene können auf verschiedene Weise angeordnet sein (siehe Abbildung 2, [70]). Schätzungsweise 50 % aller miRNAs werden von nicht Protein-kodierenden Transkripten exprimiert (intergenic miRNAs), während die übrigen miRNAs in den Introns von

Protein-kodierenden Genen lokalisiert sind, mit diesem Gen gemeinsam transkribiert und dann weiter prozessiert werden (intragenic miRNAs) [71]. Die Mehrheit der miRNAs wird von eigenständigen Transkriptionseinheiten transkribiert, sie können aber auch in sogenannten polycistronischen Clustern angeordnet sein [61]. Das größte derzeit bekannte miRNA-Cluster in Primaten ist das C19MC-Cluster auf Chromosom 19q [72]. Das miR-379/miR-656 Cluster auf Chromosom 14q ist ein weiteres bekanntes großes miRNA-Cluster [73]. Die Expression dieser beiden Cluster wird zudem durch Imprinting der paternalen und maternalen Allele beeinflusst [72, 73]. Die Expression der kodierten miRNAs findet in beiden Fällen nur vom maternalen Allel statt [72, 74].

Während der Biogenese zur reifen miRNA durchlaufen die miRNA-Gentranskripte verschiedene Prozessierungsschritte (siehe Abbildung 2, [70]).

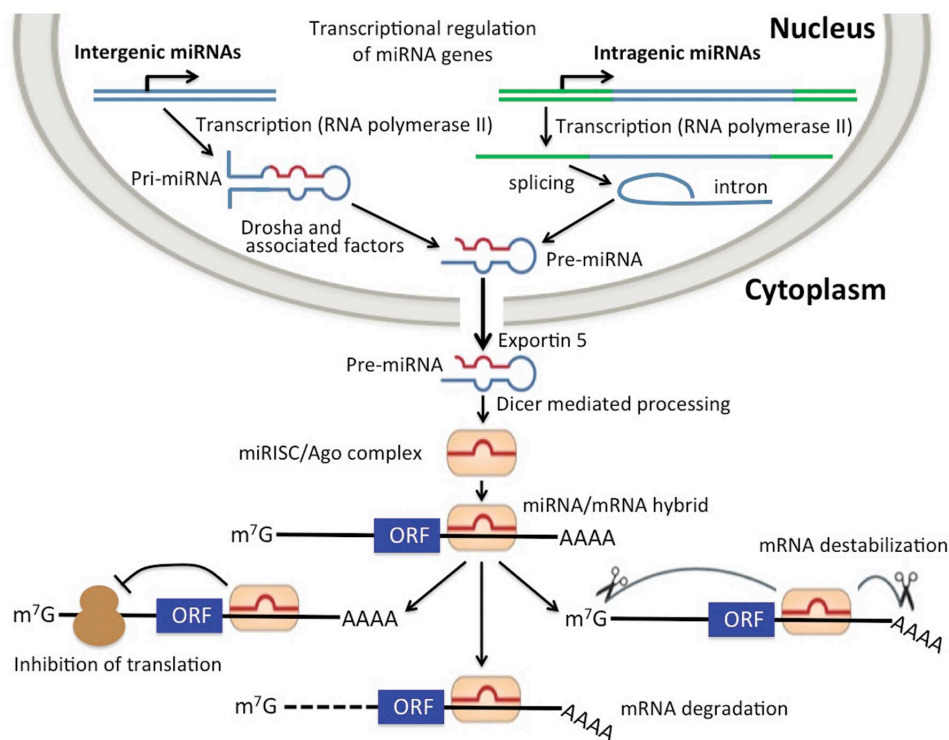


Abbildung 2: Biogenese humaner miRNAs [70]. Die miRNA-Gene werden im Nukleus durch die RNA-Polymerase II transkribiert. Die entstandene pri-miRNA wird durch Drosha und DGCR8 (Di-George syndrome critical region gene 8) zur pre-miRNA prozessiert und diese wird durch Exportin-5 aktiv in das Zytoplasma exportiert. Durch Dicer wird die pre-miRNA in die reife miRNA prozessiert, die anschließend in den RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) rekrutiert wird. Der beladene miRISC-Komplex bindet an die Ziel-mRNA und es kommt zur Inhibition der Translation, zum direkten Abbau oder der Deadenylierung und Destabilisierung der Ziel-mRNA.

Im Nukleus wird das miRNA-Gen durch die RNA-Polymerase II transkribiert, wobei die sogenannte primäre miRNA (pri-miRNA), ein mehrere hundert Nukleotide langes Transkript mit einer Guanosin-Kappe am 5' Ende sowie einer Poly(A)-Sequenz am 3' Ende, entsteht [75]. Diese pri-miRNA bildet eine Haarnadelstruktur, die von einem Mikroprozessorkomplex bestehend aus der Ribonuclease Drosha und dem dsRNA bindenden Protein DGCR8 (Di-George syndrome critical region gene 8) erkannt und zur Vorläufer-miRNA (*precursor* miRNA, pre-miRNA) prozessiert wird [76, 77]. Hierbei werden die 5' Guanosin-Kappe sowie die Poly(A)-Sequenz am 3' Ende entfernt, während die Haarnadelstruktur bestehen bleibt. Die so prozessierte pre-miRNA hat noch eine Länge von ~ 70 - 120 nt [76, 77]. Zur weiteren Prozessierung wird die pre-miRNA aktiv über Exportin-5 mit Hilfe des Kofaktors Ran-GTP aus dem Nukleus in das Zytoplasma exportiert [78, 79]. Im Zytoplasma wird die pre-miRNA von der RNase III Dicer-1 und dem assoziierten dsRNA-Bindeprotein TRBP (transactivation-responsive RNA-binding protein) zum reifen ~ 18 – 23 nt langen miRNA-Duplex prozessiert [80, 81]. Der miRNA-Duplex wird aufgelöst und nur die reife miRNA wird mit Hilfe des Argonaute 2 Proteins (Ago2) in den sogenannten RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) integriert [82]. Der Einzelstrang des miRNA-Duplex, der die größere thermodynamische Stabilität und damit schwächere Basenpaar-Bindung am 5' Ende aufweist, bildet die reife miRNA [83]. Weisen beide Enden der miRNA-Einzelstränge in etwa die gleiche thermodynamische Stabilität auf, werden auch beide Einzelstränge in den RISC-Komplex rekrutiert [83-85].

Die Regulation der Genexpression auf Ebene der mRNA erfolgt abhängig von der Komplementarität der miRNA mit der Ziel-mRNA durch verschiedene Mechanismen [64]. Bei perfekter Komplementarität der miRNA mit der 3'UTR der mRNA wird diese unmittelbar degradiert. Liegt keine komplette Komplementarität vor, wird die Translation der mRNA inhibiert. Die Inhibition der Translation ist dabei am häufigsten, da die meisten miRNAs nicht vollständig komplementär zur 3'UTR der Ziel-mRNA sind [64]. Die Nukleotide 2 - 8 der miRNA, die sogenannte Seed-Sequenz, sind bei der Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA entscheidend [86-88]. Eine weitere Möglichkeit bei nicht kompletter Komplementarität ist die Destabilisierung der mRNA durch Deadenylierung, was die Degradierung der mRNA zur Folge hat [89]. Neuere Studien haben gezeigt, dass die Destabilisierung der mRNA und in der Folge eine erniedrigte intrazelluläre mRNA Menge hauptsächliche Ursache für eine reduzierte Proteinmenge ist [90].

Eine typische 3'UTR enthält meist Bindestellen für einige bis viele verschiedene miRNAs, wodurch die Expression eines Gens nicht nur durch eine einzelne miRNA sondern das Zusammenspiel verschiedener miRNAs reguliert wird [91]. Ebenso kann eine einzelne miRNA die Transkripte mehrerer Proteine mit verwandten Funktionen in zellulären Prozessen regulieren [92]. Ein Beispiel hierfür ist die miR-29, welche eine Vielzahl von

Proteinen reguliert, die mit Fibrosen assoziiert sind. Darunter verschiedene Kollagene sowie Fibrilline, Elastin und Fibronectin [92]. Eine verminderte Expression der miR-29 wird oft bei pathogenen fibrotischen Prozessen wie der Muskeldystrophie beobachtet [93].

Die Zielgene der beiden reifen miRNA-Einzelstränge (-5p und -3p) einer Vorläufersequenz können gleich sein, sich aber auch gänzlich unterscheiden [94]. Die bevorzugte Rekrutierung einer der beiden Stränge in den RISC-Komplex kann somit weitreichende funktionelle Konsequenzen für den betroffenen Organismus haben [94].

Man geht derzeit davon aus, dass etwa 30 % aller humanen Gene durch miRNAs reguliert werden [95]. Die genaue Vorhersage von miRNA-Zielgenen gestaltet sich jedoch schwierig [95, 96]. Wie bereits erwähnt liegt selten eine perfekte Komplementarität zwischen der miRNA und der 3'UTR des Zielgens vor. Die Vorhersage von Zielgenen erfolgt jedoch zumeist auf bioinformatischer Ebene durch reinen Sequenzabgleich [97]. Hierbei sind die verwendeten Programme zur Identifizierung potentieller Zielsequenzen in der 3'UTR des Zielgens stark abhängig von der Komplementarität der Seed-Sequenz der miRNA mit entsprechenden Sequenzen in der 3'UTR. Zusätzlich berücksichtigen viele dieser Programme zur Vorhersage Daten zur thermodynamischen Stabilität und der evolutionären Konservierung vorhergesagter Bindestellen [91, 97, 98]. Eine experimentelle Validierung dieser vorhergesagten Zielgene ist somit unerlässlich. Oft können nur wenige von den Programmen vorhergesagte Zielgene auch tatsächlich als Zielgene validiert werden.

2.2.3 miRNAs und Karzinogenese

Einer der ersten Hinweise, dass miRNAs an der Karzinogenese beteiligt sein könnten, gab eine Studie im Jahr 2002, bei der man ursprünglich nach Tumorsuppressor-Genen auf Chromosom 13q14 suchte, einer genomischen Region, die bei chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie (B-CLL) häufig Deletionen aufweist [99]. Anstatt eines in dieser Region kodierten Tumorsuppressor-Proteins fand man jedoch zwei miRNA-Gene, welche für die miR-15a und die miR-16-1 kodieren [99]. Kurze Zeit später wurde gezeigt, dass viele weitere miRNA-Gene in genomisch instabilen Regionen lokalisiert sind, die mit der Karzinogenese assoziiert sind [100]. Diese Regionen sind besonders anfällig für Deletionen und Rekombinationen oder liegen in der Nähe von oder in kodierenden Bereichen für Onkogene oder Tumorsuppressor-Gene [100]. In den folgenden Jahren lieferten verschiedene Studien zu Veränderungen im miRNA-Expressionsprofil in neoplastischen Geweben im Vergleich zu gesunden Geweben einen Überblick über ein Muster deregulierter miRNAs, die für die Diagnostik und Prognose verschiedener Krebsarten von Bedeutung sein können [101-103]. Größere Studien, die das miRNA-Expressionsprofil bei verschiedenen Tumorerkrankungen untersucht haben, sowie funktionelle Untersuchungen zur Rolle von miRNAs während der

Tumorgenese, haben gezeigt, dass miRNAs selbst als Onkogene oder Tumorsuppressor-Gene fungieren können [104, 105]. Ob eine miRNA ein Onkogen oder ein Tumorsuppressor ist, hängt von den Zielgenen, der Interaktion mit diesen und der gewebespezifischen Expression ab [106]. Sogenannte onko-miRNAs reprimieren Tumorsuppressor-Gene, ein Beispiel hierfür ist die miR-21 [107]. Diese miRNA ist in zahlreichen Tumoren überexprimiert und reguliert unter anderem die Tumorsuppressoren PTEN (phosphatase und tensin homolog) und PDCD4 (Programmed cell death-4) [107]. Tumorsuppressor-miRNAs reprimieren Onkogene und beeinflussen somit wichtige Prozesse der Karzinogenese, wie etwa die Unterdrückung der Apoptose. Das anti-apoptotische Protein BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) ist unter anderem Zielgen der miRNAs miR-15a und -16-1, deren Funktion als Tumorsuppressoren in der chronischen B-Zell Leukämie entdeckt wurde [99, 108]

Eine aberrante miRNA-Expression, die eine gestörte Zellhomöostase zur Folge hat und dadurch in engem Zusammenhang mit der Karzinogenese steht, kann vielfältige Ursachen haben. Eine davon können Veränderungen im Genom wie chromosomale Rearrangements, Amplifikationen, Deletionen und Mutationen sein, welche die Expression der miRNA-Gene ebenso verändern können wie die Protein-kodierenden Gene [109]. Eine Amplifikation von miRNA-Genen im Kontext verschiedener Tumorerkrankungen wurde beim miR-17-92 Cluster auf Chromosom 13q31 gezeigt [110, 111].

In Krebszellen kommt es zudem oft zu einem Verlust über die Kontrolle der Transkription von miRNA-Genen [109]. An der Transkription des miR-17-92 Clusters ist unter anderem der onkogene Transkriptionsfaktor c-MYC (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) beteiligt [112, 113]. Eine Überexpression von c-MYC führt zur verstärkten Transkription von miRNAs im miR-17-92 Cluster [112, 113].

Epigenetische Modifikationen im Zusammenhang mit der Karzinogenese, wie Hypermethylierung von Tumorsuppressor-Genen, weitreichender Verlust von methylierten DNA-Bereichen und die posttranskriptionelle Modifikation von Histonen, können auch bei miRNA-Genen auftreten [114]. Es wurde gezeigt, dass sich der Methylierungsstatus und die Chromatinstruktur der DNA im Bereich von miRNA-Genen zwischen Krebszellen und gesunden Fibroblasten unterscheiden [115]. In Krebszellen ist die Expression der miR-127 nach Behandlung mit Substanzen, die die DNA-Methylierung inhibieren und die Deacetylierung von Histonen induzieren, deutlich erhöht. Die durch epigenetische Modifikationen induzierte Expression der miR-127, die normalerweise in Krebszellen stillgelegt ist und in 75 % aller primären Prostata- und Blasenkarzinome herunterreguliert ist, und zudem das Proto-Onkogen BCL6 (B-cell CLL/lymphoma 6) reguliert, hat gezeigt, dass die miR-127 als Tumorsuppressor fungiert [115].

Mutationen und Polymorphismen in den miRNA-Genen selbst können zu einer fehlerhaften miRNA-Expression führen und die posttranskriptionelle Regulation von Zielgenen beeinflussen [116]. Die in engem Zusammenhang mit familiärem Brust- und Eierstockkrebs stehenden Tumorsuppressor-Gene *BRCA1* (breast cancer 1) und *BRCA2* (breast cancer 2) sind Zielgene der miR-146a [117]. Ein einzelner Basenaustausch in der kodierenden Sequenz der miR-146a führt zu einer verstärkten Prozessierung der reifen miR-146a ausgehend von der pre-miR-146a sowie einer verstärkten Bindung in der 3'UTR der *BRCA1*- und *BRCA2*-mRNA. Der Basenaustausch beeinträchtigt somit die Tumorsuppressorfunktion von *BRCA1* und *BRCA2* durch erniedrigte Proteinmengen und führt bei betroffenen Frauen zu einem früheren Erkrankungsbeginn [117].

Störungen in der posttranskriptionellen Prozessierung von miRNAs können mitunter eine gestörte miRNA-Expression bedingen [109]. Die Prozessierung kann dabei an verschiedenen Punkten gestört sein [118]. Bei unterschiedlichen Primärtumoren konnte die Repression zahlreicher miRNAs mit Störungen in der miRNA Prozessierung durch Drosha in Verbindung gebracht werden [119]. Mutationen im Drosha/DGCR8 Komplex führen beispielsweise bei Patienten mit Wilms-Tumoren zu einer insgesamt niedrigeren miRNA-Expression [120, 121]. Mutationen in Dicer-1 induzieren eine aberrante miRNA-Expression, die die Proliferation mesenchymaler Zellen forciert [122].

2.2.4 miRNAs und Meningeome

MiRNAs spielen unbestritten eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression verschiedenster Tumoren, aber bisher wurden nur wenige miRNAs mit Meningeomen in Verbindung gebracht. Hierzu gehören die miRNAs miR-200a, -145, -190, -29c-3p, -219-5p, -224, -21 und -335 [123-129].

Die erste Studie zur Expression von miRNAs in Meningeomen stammt von Saydam *et al.* aus dem Jahr 2009 [124]. MiR-200a ist in benignen Meningeomen im Vergleich zu Arachnothelzellen niedriger exprimiert. Eine Überexpression führte zur Inhibition des Wachstums von Meningeomzellen *in vitro* und *in vivo*. Direkte Zielgene der miR-200a sind β -Catenin, eine wichtige Komponente des Wnt-Signalweges, der in der Tumorgenese von Meningeomen involviert ist, sowie das Protein NMHCIIb (non-muscle heavy chain IIb) welches wichtig für Zellmigration und Zellteilung ist [124, 125].

Eine weitere Studie hat sich mit der differentiellen Expression von miRNAs in Meningeomen verschiedener WHO Grade befasst [123]. Dabei wurden fünf mit der Karzinogenese assoziierte miRNAs betrachtet. Hierbei war die miR-145 in Meningeomen mit WHO Grad II und III signifikant niedriger exprimiert. Nach Überexpression der miR-145 in höhergradigen Meningeomzellen *in vitro* konnte ein Rückgang der Proliferation und Migration sowie eine

höhere Empfindlichkeit der Zellen für apoptotische Signale festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen eine wichtige Rolle der miR-145 als Tumorsuppressor-miRNA in Meningeomen [123].

Die Kombination aus hoher Expression der miR-190 und niedriger Expression der miR-29c-3p und miR-219-5p ist signifikant mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bei Meningeomen assoziiert [126].

Die Überexpression der miR-224 korreliert in Meningeomen mit steigendem WHO Grad und Patienten mit einer niedrigen Expression der miR-224 im Tumor bleiben für längere Zeiträume rezidiv frei [127]. Ein Zielgen der miR-224 ist *ERG2* (early growth response 2). Die Inhibition der miR-224 in Meningeomzellen *in vitro* führte zu einem Rückgang der Proliferation. Über den *ERG2*-*BAK1* (*BCL2* antagonist/killer1) induzierten Apoptose-Signalweg kommt es zu erhöhter Apoptose nach Inhibition der miR-224 [127].

Für miR-21, deren Bedeutung als onko-miRNA bereits in zahlreichen Tumoren untersucht wurde [107], konnte in Meningeomen eine Überexpression in atypischen und anaplastischen Meningeomen im Vergleich zu benignen Meningeomen gezeigt werden [128].

MiR-335 ist in Meningeomen im Vergleich zu Arachnothelzellen überexprimiert [129]. Eine Überexpression der miR-335 korrelierte mit einer gesteigerten Zellproliferation und der Inhibition der Zellzyklus-Kontrolle beim Übergang von der G_0 zur G_1 -Phase *in vitro*. Das Tumorsuppressor-Protein Rb1 ist ein direktes Zielgen der miR-335 [129].

2.3 Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Validierung differentiell exprimierter miRNAs in Meningeomen. Anschließend sollten Zielgene einer ausgewählten, deregulierten miRNA identifiziert und experimentell validiert werden. Auf Basis einer *in vitro* Zellkultur sollten die Auswirkungen der Deregulation dieser ausgewählten miRNA auf Meningeomzellen untersucht werden.

Als Grundlage diente hierbei ein von Dr. Nicole Ludwig (Institut für Humangenetik, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) mittels Microarrays erstelltes miRNA-Expressionsprofil von 1205 miRNAs in 55 Meningeomen verschiedener WHO Grade und histologischer Subtypen. Aus dem miRNA-Expressionsprofil wurden zunächst einzelne relevante miRNAs für eine Validierung mittels RT-qPCR ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Validierung sollten wiederum in einem unabhängigen Patientenkollektiv bestätigt werden.

Nach Validierung einer signifikanten differentiellen Expression ausgewählter miRNAs sollten anschließend für eine miRNA potentielle Zielgene im Zusammenhang mit Meningeomen identifiziert werden. Hierbei dient eine bioinformatische Datenbanksuche zur Vorhersage potentieller Zielgene mit Hilfe der Seed-Sequenz dieser miRNA als Grundlage. Der Fokus lag hierbei auf Zielgenen, die direkte Komponenten oder exogene Effektoren von zellulären Signalwegen sind, die in Meningeomen als dereguliert bekannt sind. Zur Validierung der Zielgene sollten Luciferase-Reporterassays sowie Western-Blots durchgeführt werden. Des Weiteren sollten die Auswirkungen der Deregulation einer ausgewählten miRNA auf Proliferation und Apoptose in Meningeomzellen *in vitro* untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten dazu beitragen, ein umfangreiches Bild über den Einfluss von miRNAs bei der Entstehung und Progression von Meningeomen durch posttranskriptionelle Regulation von Zielgenen und Deregulation zellulärer Signalwege zu erstellen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Medien

Chemikalien und Medien

3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)
Natriumsalz
3-Mercapto-1,2-propanediol
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) (37,5:1)
Agar, Bacto™
Agarose, Ultra Pure™
Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Ampicillin-Natriumsalz
Bovines Serumalbumin (BSA)
Bromphenolblau
Calciumchlorid (CaCl₂)
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat
Eisessig
Ethanol
Ethidiumbromid
Fötale Kälberserum (FCS) (Charge 1243T)
Glucose
Glycerin
Glycin
Hefe-Extrakt, Bacto™
Kaliumacetat (KOAc)
Kaliumchlorid (KCl)
Magnesiumchlorid (MgCl₂)
Methanol
Milchpulver
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Natriumchlorid (NaCl)
Natriumdodecylsulfat (SDS)

Hersteller

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bio-Rad (Hercules, USA)
BD (Franklin Lakes, USA)
Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, USA)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Serva (Heidelberg, Deutschland)
Roche (Basel, Schweiz)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Gibco/Life Technologies (Carlsbad, USA)
Gibco/Life Technologies (Carlsbad, USA)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
VWR (Radnor, USA)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Zentrales Chemikalienlager, UdS, Saarbrücken
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BD (Franklin Lakes, USA)
VWR (Radnor, USA)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Zentrales Chemikalienlager, UdS, Saarbrücken
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
VWR (Radnor, USA)
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Natriumhydroxid (NaOH)	Zentrales Chemikalienlager, UdS, Saarbrücken
Penicillin/Streptomycin (P/S) (100x)	Gibco/Life Technologies (Carlsbad, USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypton, Bacto™	BD (Franklin Lakes, USA)
Tween®20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Xylencyanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.1.2 Enzyme und Reaktionskits

Enzyme

<i>Bgl</i> II (10000 U/ml)
<i>Eco</i> RI (20000 U/ml)
<i>Ngo</i> MIV (10000 U/ml)
<i>Nru</i> I-HF® (10000 U/ml)
<i>Pml</i> I (20000 U/ml)
rAPid Alkaline Phosphatase (1 U/μl)
<i>Sac</i> I-HF® (20000 U/ml)
<i>Spe</i> I-HF® (20000 U/ml)
T4 DNA-Ligase (400000 U/ml)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/μl)
Trypsin-EDTA

Hersteller

NEB (Ipswich, USA)
NEB (Ipswich, USA)
NEB (Ipswich, USA)
NEB (Ipswich, USA)
NEB (Ipswich, USA)
Roche (Basel, Schweiz)
NEB (Ipswich, USA)
NEB (Ipswich, USA)
NEB (Ipswich, USA)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Gibco/Life Technologies (Carlsbad, USA)

Reaktionskits

Agilent RNA 6000 Nano Kit
Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor® 488 and Propidiumiodide (PI)
Dual-Luciferase® Reporter Assay System
HiPerFect Transfection Reagent
<i>Library Efficiency</i> ® DH5α™ Competent Cells
miRNeasy Mini Kit
miScript II RT Kit
miScript SYBR® Green PCR Kit
NucleoBond® PC100
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up
PolyFect Transfection Reagent
SignalFire™ ECL Reagenz

Hersteller

Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, USA)
Promega (Mannheim, Deutschland)
Qiagen (Hilden, Deutschland)
Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, USA)
Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiagen (Hilden, Deutschland)
Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Qiagen (Hilden, Deutschland)
Cell Signaling Technology (Danvers, USA)

3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Hersteller

Agilent (Santa Clara, USA)
 Applied Biosystems/Life Technologies (Carlsbad, USA)

 BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
 Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
 Bio-Rad (Hercules, USA)

 BioCision (Mill Valley, USA)
 Bioer (Hangzhou, China)
 Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
 Brand (Wertheim, Deutschland)
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

 GE Healthcare (Little Chalfont, GB)
 GFL (Burgwedel, Deutschland)
 Greiner BioOne (Frickenhäusen, Deutschland)

 Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

 IKA (Staufen, Deutschland)
 Infors (Basel, Schweiz)
 Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, USA)

 Logos Biosystems (Annandale, USA)
 Lumenera (Ottawa, Kanada)
 Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland)
 Millipore (Bedford, USA)
 Pechiney (Chicago, USA)
 Peqlab/VWR (Erlangen, Deutschland)
 Qiagen (Hilden, Deutschland)
 Sanyo (Osaka, Japan)

Geräte und Verbrauchsmaterial

Agilent 2100 Bioanalyzer
 Real-Time PCR System (StepOnePlus™); 96-Well Platten (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL); Klebefilm für 96-Well Platten (MicroAmp® Optical Adhesive Film)
 FACScan; FACS-Röhrchen
 Luminometer (Lumat LB 9507)

 Powersupply (Model 200/2.0); ChemiDoc™ Touch Imaging System
 CoolCell™
 Thermomix (Mixing Block MB-102)
 EasyPhor Medi Elektrophoresekommer, Vortexer

 Pipettierhilfe (accu-jet® pro)
 Thermoblock (TCR 100)
 CO₂-Inkubator; Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml), Küvetten (UVette®), Photometer (Biophotometer)
Hybond™-P PVDF-Membran; Whatman™-Papier
 Schüttelwasserbad
 Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml); Reaktionsgefäße (12 ml, 15 ml, 50 ml); Zellkulturflaschen (75 cm²); Zellkulturplatten (6-Well, 24-Well); Kryogefäße (2 ml)
 Tischzentrifuge (Mikro 185), Kühlzentrifuge (Universal 320R)
 Magnetrüher (IKAMAG RCT), Schüttler (KS 125 Basic)
 Schüttelinkubator (Multitron II)
 Blotting-Kammer (XCell II™ Blot Module);
 Elektrophoresekommer (XCell SureLock® Mini-Cell); „XCell SureLock™“ Gelkassetten (1,0 mm)
 Luna™ *fl* Zellzählgerät, Counting-Slides für Luna™ *fl*
 CCD-Kamera (LU105M)
 pH-Meter (Seven Easy)
 Milliporewasseranlage Milli-Q
 Parafilm M
 Thermocycler (PeqStar 2X)
 QIAcube, TissueLyser LT
 - 70°C Gefriertruhe (Ultra Low)

Sartorius (Göttingen, Deutschland)	Feinwaage (Basic); Sterilbank (BioHit Polaris); Sterilfilter (0,2 µM)
Sigma (Osterode am Harz, Deutschland)	Kühlzentrifuge (2-16K)
Sorensen Bioscience (Salt Lake City, USA)	Spitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
System (Wettenberg, Deutschland)	Autoklav (VE-150)
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	Brutschrank (Jouan); NanoDrop™ 2000
Wealtec (Sparks, USA)	Geldokumentation (UV-Transilluminator)
Zeiss (Jena, Deutschland)	Lichtmikroskop (Axiovert 25)

3.1.4 Größenstandards für Agarose- und SDS-Polyacrylamidgele

Für die Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5.2) wurde die Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0,1-10 kb) (NEB, Ipswich, USA) in Abbildung 3 verwendet.

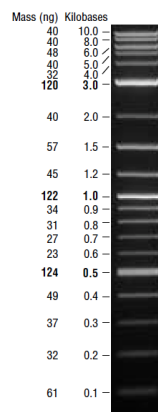


Abbildung 3: DNA-Größenstandard. Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0,1-10 kb) (Datasheet NEB)

Für die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen nach Auftrennung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, siehe Kapitel 3.8.3) wurde der Protein-Größenstandard *Precision Plus Protein™ Standard Dual Color* der Firma Bio-Rad (Hercules, USA) verwendet (siehe Abbildung 4).

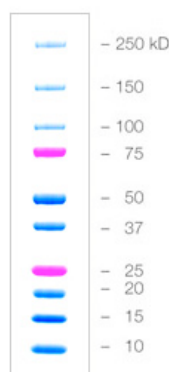


Abbildung 4: Protein-Größenstandard. *Precision Plus Protein™ Standard Dual Color* (Bio-Rad, Hercules, USA)

3.1.5 Vektoren

pMIR-REPORT™

Mit Hilfe des eukaryotischen Reportervektors pMIR-REPORT™ (Ambion/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) können Effekte von miRNAs auf Sequenzen in der 3'UTR einer potentiellen Ziel-mRNA untersucht werden. Abbildung 5 zeigt eine Vektorkarte von pMIR-REPORT™.

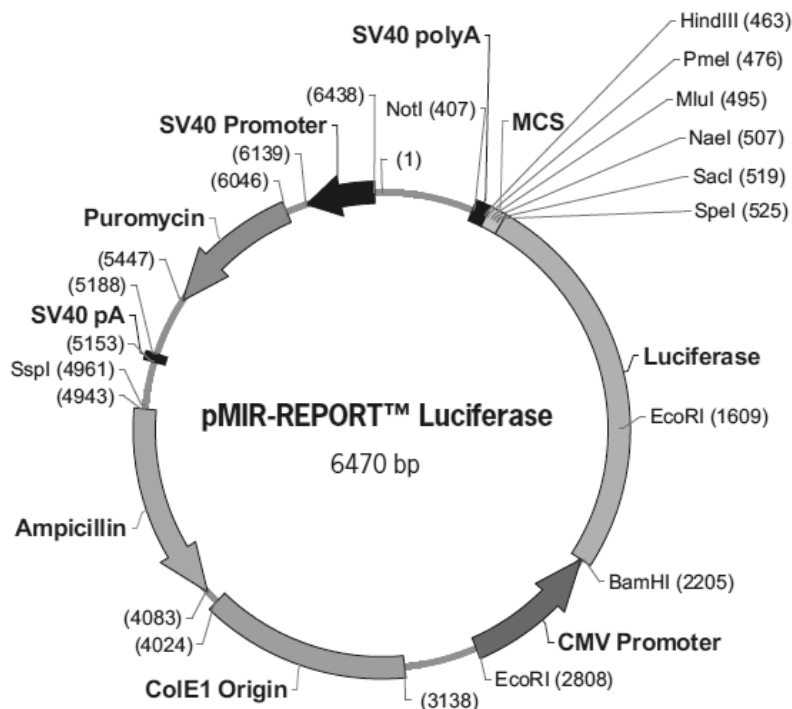


Abbildung 5: Vektorkarte von pMIR-REPORT™. Reportervektor für die Analyse regulatorischer Effekte von miRNAs auf die 3'UTRs von Ziel-mRNAs (Quelle: Ambion/Thermo Fisher Scientific)

Direkt anschließend an das Firefly-Luciferase-Gen befindet sich eine sogenannte Multiple-Cloning-Site (MCS), über den der gewählte 3'UTR Bereich einer mRNA in den Vektor eingebracht wird. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Derivat von pMIR-REPORT™ verwendet, dass von der Arbeitsgruppe Meister (Max-Planck-Institut, Martinsried, Deutschland) hergestellt wurde [130] und im Folgenden als pMIR-RNL-TK bezeichnet wird. In diesem Vektor befindet sich zusätzlich das Renilla-Luciferase-Gen, welches konstitutiv über den SV40-Promotor exprimiert wird. Durch die Expression einer zweiten Luciferase vom gleichen Plasmid kann eine interne Normalisierung der Luciferase-Aktivitäten durchgeführt werden. Eine weitere Modifikation ist der Austausch des Promotors für das Firefly-Luciferase-Gen. Im Ursprungsplasmid befindet sich der CMV-Promotor (siehe Abbildung 5), der durch einen HSV-TK Promotor ausgetauscht wurde. Als Selektionsmarker von transformierten Bakterien dient ein Ampicillin-Resistenzgen.

pSG5

Der pSG5-Vektor (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ist ein High-Copy-Plasmid, das für die Expression *in vitro* und *in vivo* genutzt werden kann. Die Expression nach transienter Transfektion von Zelllinien wird durch den SV40-Promotor sowie das entsprechende Polyadenylierungssignal gesteuert. Eine *in vitro* Transkription kann mit Hilfe des T7-Promotors durchgeführt werden. Die gewünschte Expressions-Sequenz kann über Restriktionsenzym-Schnittstellen (*EcoRI*, *BamHI* und *BglII*) hinter den Promotoren in den Vektor eingebracht werden. Ein Ampicillin-Resistenzgen dient als Selektionsmarker in transformierten Bakterien. Abbildung 6 zeigt die Vektorkarte von pSG5.

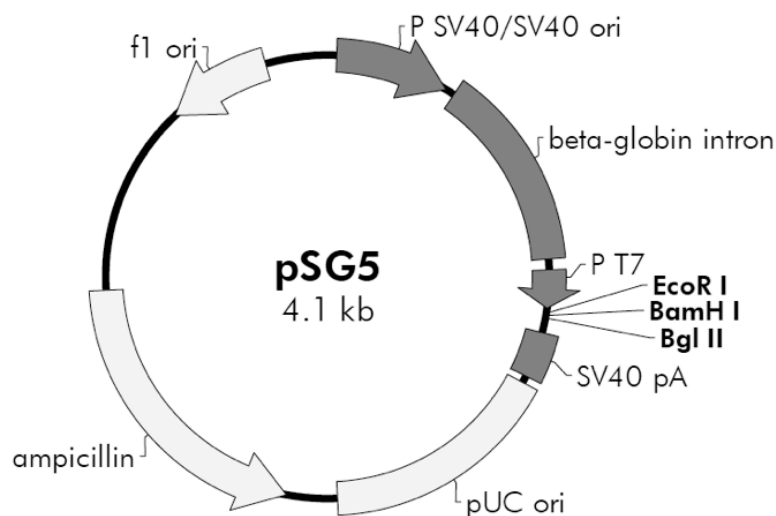


Abbildung 6: Vektorkarte von pSG5 (Quelle: Manual, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Der in dieser Arbeit verwendete pSG5-Expressionsvektor für miR-34a-5p und miR-34a-3p wurde durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Zur Herstellung des pSG5-miR-34a Expressionsvektors wurde die miRNA-Vorläufersequenz (Nukleotide 9151617-9151816 auf Chromosom 1) für miR-34a, mit zusätzlich 40 Basenpaaren up- und downstream dieser Sequenz, *de novo* synthetisiert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BglII* in den pSG5-Vektor ligiert.

3.1.6 DNA-Oligonukleotide und Reportervektor-Konstrukte

In der vorliegenden Arbeit wurden Reportervektor-Konstrukte auf Basis von pMIR-RNL-TK zur Untersuchung regulatorischer Effekte der miR-34a-3p auf die 3'UTR verschiedener potentieller Zielgene hergestellt. Die hierzu verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) in Tabelle 2 wurden alle von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Tabelle enthält alle Primer zur Herstellung der Reportervektor-Konstrukte sowie zur Mutagenese der potentiellen Bindestellen in den jeweiligen 3'UTRs.

Tabelle 3 enthält alle mit Hilfe der in Tabelle 2 aufgelisteten Primer in der vorliegenden Arbeit hergestellten Reportervektor-Konstrukte, die zur Untersuchung regulatorischer Effekte auf die jeweiligen 3'UTRs verwendet wurden. Alle 3'UTRs wurden aufgrund des verwendeten pSG5-miR-34a Expressionsvektors so kloniert, dass sie nur potentielle Bindestellen für miR-34a-3p enthielten. Hierdurch wurde ausgeschlossen, dass beobachtete Effekte auf die ebenfalls vom Plasmid exprimierte miR-34a-5p zurückzuführen wären.

Für alle Konstrukte sind, die jeweils verwendeten Primerpaare, die GenBank Nummer der mRNA des potentiellen Zielgens, die klonierten Nukleotide der mRNA, die Größe des einklonierten Fragments, sowie die Positionen der potentiellen Bindestellen für miR-34a-3p in der 3'UTR, aufgeführt. Außerdem ist angegeben, gegen welche Restriktionsenzym-Schnittstelle die jeweilige miRNA-Bindestelle bei der Mutagenese ausgetauscht wurde.

Tabelle 2: PCR-Primer zur Herstellung der Reportervektor-Konstrukte von pMIR-RNL-TK und der Mutagenese von miRNA Bindestellen. Die Restriktionsenzym-Schnittstellen zur Klonierung in pMIR-RNL-TK sind in den jeweiligen Sequenzen unterstrichen. Mutierte Sequenzen sind fett gedruckt.

Primernamen	Orientierung	Sequenz (5'-3' Orientierung)	Verwendung
pMIR-RNL-TK for	forward	GAAGTACCGAAAGGTCTTACCG	Colony PCR/Sequenzierung von pMIR-RNL-TK Konstrukten, Klonierung BCL2 3'UTR
pMIR-RNL-TK rev	reverse	CCAAGCTAGCGGCCGCATACAA	Colony PCR/Sequenzierung von pMIR-RNL-TK Konstrukten, Klonierung BCL2 3'UTR
pMIR-BCL2 Mut BS1 for	forward	CCAGTACCTTAAGCC CACGTGGT GTATATTCATATATTTTG	Mutagenese BCL2 3'UTR Bindestelle 1
pMIR-BCL2 Mut BS1 rev	reverse	CAAAATATATGAATATACACC CACGTGGGCTTAAGGTACTGG	Mutagenese BCL2 3'UTR Bindestelle 1
pMIR-BCL2 Mut BS2 for	forward	CTCCGAATGTCTGGAAT TCGCGAG GAGCTCAGAATTCCAC	Mutagenese BCL2 3'UTR Bindestelle 2
pMIR-BCL2 Mut BS2 rev	reverse	GTGGAATTCTGAGCTCC TCGCGA TTCCAGACATTCGGAG	Mutagenese BCL2 3'UTR Bindestelle 2
5'-SMAD4-SpeI	forward	GGACTAGTGTCTTTTACCGTTGGG	Amplifikation 3'UTR SMAD4 aus cDNA
3'-SMAD4-SacI	reverse	CGAGCTCCCAACCTTGTGCCTAG	Amplifikation 3'UTR SMAD4 aus cDNA
pMIR-SMAD4 Mut for	forward	GAATAATCCAGTATTT TCGCGAGT TAAAGGCAGAGAAG	Mutagenese Bindestelle SMAD4 3'UTR
pMIR-SMAD4 Mut rev	reverse	CTTCTCTGCCTTTAA CTCGCGAA ATACTGGATTATTC	Mutagenese Bindestelle SMAD4 3'UTR
5'-FRAT1-SpeI	forward	GGACTAGTGACAGCAGCTTATAATGG	Amplifikation 3'UTR FRAT1 aus cDNA
3'-FRAT1-SacI	reverse	CGAGCTCGGAGATCAGAGAAATGTG	Amplifikation 3'UTR FRAT1 aus cDNA
pMIR-FRAT1 Mut for	forward	GGAATTGTGGCTATCT TCGCGAAT AGGATTTTAACCTTAAC	Mutagenese Bindestelle FRAT1 3'UTR
pMIR-FRAT1 Mut rev	reverse	GTTAAGTTAAAATCCTAT TCGCG AGATAGCCACAATTCC	Mutagenese Bindestelle FRAT1 3'UTR
5'-FGF9-SpeI	forward	GGACTAGTGACAGTTTCTTCACTTGAGC	Amplifikation 3'UTR FGF9 aus cDNA
3'-FGF9-SacI	reverse	CGAGCTCGCTTTAAGTTCACTGCG	Amplifikation 3'UTR FGF9 aus cDNA
pMIR-FGF9 Mut for	forward	GCTTGGATGGGAATATGC CACGTG TTGTTCTGCACTTAAAGG	Mutagenese Bindestelle FGF9 3'UTR
pMIR-FGF9 Mut rev	reverse	CCTTTAAGTGCAGAACAA CACGT GCATATTTCCCATCCAAGC	Mutagenese Bindestelle FGF9 3'UTR
5'-FOS-SpeI	forward	GGACTAGTGTGAAACACACCAGGCTGTG	Amplifikation 3'UTR FOS aus cDNA
3'-FOS-SacI	reverse	CGAGCTCCCACTCAACAATGCAATG	Amplifikation 3'UTR FOS aus cDNA
5'-SRC-SpeI	forward	GGACTAGTCCCTTTGTGTAAGGTG	Amplifikation 3'UTR SRC aus cDNA
3'-SRC-SacI	reverse	CGAGCTCCTGTTGATCAGATTCTGAGG	Amplifikation 3'UTR SRC aus cDNA

Tabelle 3: Übersicht der auf Basis von pMIR-RNL-TK hergestellten Reportervektor-Konstrukte. Für alle Plasmide sind die zur Herstellung verwendeten Primerpaare, der klonierte Bereich der mRNA-Sequenz mit der entsprechenden GenBank Nummer, die Position der potentiellen Bindestellen für miR-34a-3p in der 3'UTR und die Größe des klonierten Fragments angegeben. Falls eine Mutagenese durchgeführt wurde, ist angegeben, gegen welche Restriktionsenzym-Schnittstelle die miRNA-Bindestelle ausgetauscht wurde.

Plasmid	Primer	GenBank Nummer/ Nukleotide der mRNA	Position Bindestelle miR-34a-3p 3'UTR [bp]	Fragmentgröße [bp]	Mutation Bindestelle
pMIR-RNL-TK BCL2-3'UTR	<i>de novo</i> synthetisiert	NM_000633.2 Nukleotide 1796-2511	787; 1090	716	-
pMIR-RNL-TK BCL2-3'UTR mut I	pMIR-RNL-TK for pMIR-RNL-TK rev pMIR-BCL2 Mut BS1 for pMIR-BCL2 Mut BS1 rev	NM_000633.2 Nukleotide 1796-2511	787; 1090	716	787 → Pml
pMIR-RNL-TK BCL2-3'UTR mut II	pMIR-RNL-TK for pMIR-RNL-TK rev pMIR-BCL2 Mut BS2 for pMIR-BCL2 Mut BS2 rev	NM_000633.2 Nukleotide 1796-2511	787; 1090	716	1090 → NruI
pMIR-RNL-TK BCL2-3'UTR mut I/II	pMIR-RNL-TK for pMIR-RNL-TK rev pMIR-BCL2 Mut BS2 for pMIR-BCL2 Mut BS2 rev	NM_000633.2 Nukleotide 1796-2511	787; 1090	716	787 → Pml 1090 → NruI
pMIR-RNL-TK SMAD4-3'UTR	5'-SMAD4-Spel 3'-SMAD4-SacI	NM_005359.5 Nukleotide 2199-2990	370	792	-
pMIR-RNL-TK SMAD4-3'UTR mut	5'-SMAD4-Spel 3'-SMAD4-SacI pMIR-SMAD4 Mut for pMIR-SMAD4 Mut rev	NM_005359.5 Nukleotide 2199-2990	370	792	NruI
pMIR-RNL-TK FRAT1-3'UTR	5'-FRAT1-Spel 3'-FRAT1-SacI	NM_005479.3 Nukleotide 2157-2625	1471	469	-
pMIR-RNL-TK FRAT1-3'UTR mut	5'-FRAT1-Spel 3'-FRAT1-SacI pMIR-FRAT1 Mut for pMIR-FRAT1 Mut rev	NM_005479.3 Nukleotide 2157-2625	1471	469	NruI
pMIR-RNL-TK FGF9-3'UTR	5'-FGF9-Spel 3'-FGF9-SacI	NM_002010.2 Nukleotide 1469-1999	157	531	-
pMIR-RNL-TK FGF9-3'UTR mut	5'-FGF9-Spel 3'-FGF9-SacI pMIR-FGF9 Mut for pMIR-FGF9 Mut rev	NM_002010.2 Nukleotide 1469-1999	157	531	Pml
pMIR-RNL-TK FOS-3'UTR	5'-FOS-Spel 3'-FOS-SacI	NM_005252.3 Nukleotide 1474-1937	399; 443	464	nicht durchgeführt
pMIR-RNL-TK SRC-3'UTR	5'-SRC-Spel 3'-SRC-SacI	NM_005417.4 Nukleotide 3882-4111	2013	230	nicht durchgeführt

3.1.7 DNA-Oligonukleotide für die RT-qPCR

Alle für die RT-qPCR verwendeten miScript Primer Assays sind von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen worden und in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: miScript Primer Assays für die RT-qPCR. Die Sequenz der Oligonukleotide wird vom Hersteller nicht angegeben.

miRNA	Sequenz der Ziel-miRNA (5'-3' Orientierung)	Hersteller Katalognummer
Universalprimer	nicht bekannt	Bestandteil des miScript SYBR® Green PCR Kits
miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	MS00007609
miR-34a-3p	CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU	MS00009534
miR-136	ACUCCAUUUUUUGAUGAUGGA	MS00003479
miR-376c	AACAUAAGAGGAAAUUCCACGU	MS00004046
miR-195	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	MS00003703
miR-497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU	MS00004361
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	MS00009079
miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUGGUUA	MS00007602
miR-218	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	MS00006769
miR-181a	AACAUUAACGCUGUCGGUGAGU	MS00008827
miR-101	UACAGUACUGUGAUAACUGAA	MS00008372
miR-377	AUCACACAAAGGCAACUUUUGU	MS00004095
RNU6B	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAAG ATACAGAGAAGATTAGCATGGCCCTGCGCAAGGATG ACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTT ^a	MS00033740

^a entspricht der Sequenz des mRNA-Transkripts

3.1.8 RNA-Oligonukleotide

Alle RNA-Oligonukleotide in Tabelle 5, die zur Transfektion in der Zellkultur verwendet wurden, wurden von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen.

Tabelle 5: RNA-Oligonukleotide zur Transfektion in der Zellkultur. Die Sequenz der Oligonukleotide wird vom Hersteller nicht angegeben.

Name	Hersteller Katalognummer
AllStars Negative Control siRNA (scrambled Mimic)	SI03650318
miScript Inhibitor Negative Control (scrambled Inhibitor)	1027271
miR-34a-3p (Mimic)	MSY0004557
Anti-miR-34a-3p (Inhibitor)	MIN0004557

Die verwendeten Negativkontrollen besitzen keine Homologie zu einem derzeit bekannten Säugergen. Mit Hilfe der Negativkontrollen sollen unspezifische Effekte auf die Genexpression oder den Phänotyp ausgeschlossen werden. Die AllStars Negative Control

siRNA diente als Kontrolle für miR-34a-3p, die miScript Inhibitor Negative Control als Kontrolle für anti-miR-34a-3p.

3.1.9 Primäre und sekundäre Antikörper

Die in dieser Arbeit zur Immunodetektion von Proteinen im Western-Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper sind mit den entsprechend eingesetzten Verdünnungen in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
α-β-Actin (AC-15, monoklonal, Maus)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)	1:5000
α-SMAD4 (#9515, polyklonal, Kaninchen)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	1:1000
α-BCL2 (#2876, polyklonal, Kaninchen)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	1:1000
α-FRAT1 (ab108405, monoklonal, Kaninchen)	Abcam (Cambridge, UK)	1:1000
HRP-conjugated Goat-α-Rabbit IgG (H+L)	Dianova (Hamburg, Deutschland)	1:1000-1:2500
HRP-conjugated Goat-α-Mouse IgG (H+L)	Dianova (Hamburg, Deutschland)	1:7500

3.1.10 Patientenmaterial

Alle Meningeom-Tumorproben wurden am Institut für Neurochirurgie, Prof. Dr. J. Oertel, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, gesammelt und zur Verfügung gestellt. Die Tumorproben wurden während der Operation am Patienten gewonnen, am Institut für Humangenetik in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert. Für das miRNA-Expressionsprofil wurde Gesamt-RNA aus Tumorgewebe von 55 Meningeom-Patienten isoliert. Dieses Patientenkollektiv wurde auch für die Validierung differentiell exprimierter miRNAs mittels RT-qPCR verwendet und wird im nachfolgenden als Set 1 bezeichnet. Das unabhängige Patientenkollektiv, nachfolgend als Set 2 bezeichnet, bestand aus 95 Meningeom-Tumorproben, die konsekutiv zwischen Januar 2012 und Oktober 2013 am Institut für Neurochirurgie gesammelt wurden. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht beider Patientenkollektive mit der Verteilung der Tumoren nach WHO Grad und histologischem Subtyp. Weitere klinische Daten zu allen Patientengruppen finden sich im Anhang in den Tabellen A1 und A2.

Tabelle 7: Übersicht der Patientenkollektive. Für beide Kollektive ist die Verteilung nach WHO Graden und histologischen Subtypen angegeben. Detaillierte klinische Daten zu allen Patientengruppen finden sich im Anhang in den Tabellen A1 und A2.

WHO Grad	Histologischer Subtyp	Set 1	Set 2
I	Meningothelial	12	37
	Fibroblastisch	10	6
	Transitional	11	7
	Psammomatös	-	2
	Angiomatös	-	1
	Mikrozystisch	-	6
	Sekretorisch	-	1
II	Atypisch	10	23
	Chordoid	-	2
	Hirninvasiv	-	3
III	Anaplastisch	12	7
Gesamt		55	95

3.1.11 Software, Online-Tools und Datenbanken

- Agilent 2100 Bioanalyzer Expert Software: Auswertung der Gelelektrophorese und Erstellung von Abbildungen
(<http://www.genomics.agilent.com/en/Bioanalyzer-System/2100-Expert-Software/?cid=AG-PT-106&tabId=AG-PR-1002>)
- Biomedical PowerPoint Toolkits: Bildelemente zur Erstellung von Abbildungen
(<http://www.motifolio.com/>)
- CellQuest Pro: Auswertung Durchflusszytometrie
(<http://www.bdbiosciences.com/eu/home>)
- DeVision G V2.0: Gel-Dokumentation
(DeCon Science Tec, Hohengandern, Deutschland)
- Endnote X7: Literaturverzeichnis
(<http://endnote.com/>)
- FinchTV V1.5.0: Auswertung von Chromatogrammen und Sequenzen
(<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml/>)
- Image Lab™ Software: Quantifizierung und Prozessierung der Western-Blot Aufnahmen
(<http://www.bio-rad.com/>)

- KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway Database:
Übersichtskarten zellulärer Signalwege
(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)
- Microsoft Office Mac 2011: Textverarbeitung (Word), Tabellenverarbeitung (Excel),
Erstellen von Abbildungen (PowerPoint)
- miRBase [68, 69]: Ermittlung von miRNA Sequenzen
(<http://www.mirbase.org/>)
- miRTarBase [131]: Ermittlung experimentell validierter miRNA-Zielgene
(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)
- NCBI (National Center for Biotechnology Information): Datenbank
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- TargetScan Human 5.2 Custom [132]: Vorhersage von miRNA-Zielgenen
(http://www.targetscan.org/vert_50/seedmatch.html)
- TargetScan Human 7.1 [132]: Vorhersage von miRNA-Zielgenen
(http://www.targetscan.org/vert_71/)
- Webcutter 2.0: Bestimmung von Restriktionsschnittstellen, *in silico* Verdau
(<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>)
- StepOnePlus™ Software v2.3: Auswertung der RT-qPCR
(<http://www.thermofisher.com/de/de/home/technical-resources/software-downloads/StepOne-and-StepOnePlus-Real-Time-PCR-System.html>)

3.2 RNA-Methoden

3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA mittels QIAGEN® miRNeasy Mini Kit

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Meningeom-Tumorgewebe wurden Kryo-Dünnschnitte der Tumoren verwendet. In einem Dünnschnitt liegen die Zellen nahezu als Monolayer vor, eine mechanische Zerstörung des Gewebeverbandes entfällt. Die Isolation wurde mit Hilfe des miRNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte teilweise automatisiert mit Hilfe des QIAcube. Die Probe wurde zunächst in QIAzol, einem Gemisch aus Guanidinthiocyanat (GTC) und Phenol, für 5 min bei RT lysiert. Nach Zugabe von Chloroform wurde das Homogenat für 15 sek geschüttelt und anschließend für 15 min bei 12000 x g und 4 °C die Phasentrennung durchgeführt. Es erfolgt eine Auftrennung in drei Phasen: die untere, organische Phenol-Chloroform Phase enthält die Proteine, die obere wässrige Phase enthält die RNA und die dazwischen liegende Interphase enthält die DNA. Die wässrige Phase wurde abgenommen und alle folgenden Arbeitsschritte wurden automatisiert im QIAcube durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde durch Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt und über eine Säule mit Silica-Membran aufgereinigt. Die Bindung der RNA-Moleküle an die Silica-Membran ist abhängig von pH-Wert und Salzkonzentration. Es wurden insgesamt drei Waschschrte mit salzhaltigen Puffern durchgeführt, während denen die RNA an die Membran gebunden bleibt. Die RNA wurde anschließend in 50 µl RNase freiem Wasser von der Säule eluiert.

Die Isolation von Gesamt-RNA aus HEK293T Zellen wurde entsprechend gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

3.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration, der aus Meningeom-Tumorgewebe und HEK293T Zellen isolierten Gesamt-RNA, wurde im Anschluss an die Isolation am NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer gemessen. Als Referenz diente RNase freies Wasser. Der NanoDrop™ 2000 misst das komplette Absorptionsspektrum der Probe im Wellenlängenbereich von 220 bis 350 nm. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Zur Messung wird 1 µl RNA eingesetzt und die Konzentration berechnet sich aus der Absorption der Probe bei 260 nm. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht dabei 40 µg RNA/ml.

Hieraus ergibt sich:

$$c\left[\frac{\mu\text{g RNA}}{\text{ml}}\right] = A_{260} \times 40$$

Zusätzlich zur Ausgabe der Konzentration berechnet die Software des NanoDrop™ 2000 die Quotienten des Absorptionswertes bei 260 nm zu den Absorptionswerten bei 230 bzw. 280 nm. Ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm deutet auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, Verunreinigungen mit GTC wären an einem erhöhten Absorptionswert bei 230 nm zu erkennen. Beide Quotienten sollten im Idealfall zwischen 1,8 und 2 liegen, schlechtere Werte wären ein Hinweis auf entsprechende Verunreinigungen.

3.2.3 Qualitätskontrolle isolierter Gesamt-RNA mittels des Agilent 2100 Bioanalyzer

Der Agilent 2100 Bioanalyzer überträgt das Prinzip einer klassischen Gelelektrophorese auf ein Chip-Format. Der Chip besitzt Kapillaren, durch die sich die negativ geladene RNA in einem Gelpolymer nach Anlegen einer Spannung wie bei einem klassischen Agarosegel von der Kathode zur Anode bewegt. Die Geschwindigkeit mit der sich die RNA durch das Gelpolymer bewegt ist dabei abhängig von der Größe der RNA-Fragmente. Wie bei einem Agarosegel passieren größere Fragmente die Matrix langsamer als kleinere Fragmente. Zur Durchführung der Analyse wurden zunächst die Kapillaren mit dem Gelpolymer, das zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt wurde, beladen. Der Farbstoff interkaliert in die RNA und beim Passieren eines Lasers kann ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, dessen Intensität von der Menge der RNA abhängig ist.

Die Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA wurde mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit durchgeführt. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen, die das Laufverhalten der RNA im Gelpolymer beeinflussen könnten, wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst für 2 min auf 70 °C erhitzt. Nach Beladung des Chips mit dem Gelpolymer wurden je 1 µl der isolierten Gesamt-RNA in die entsprechenden Probenkammern pipettiert, eine Probenkammer wurde mit einem Größenstandard beladen. In jede Probekammer wurde zusätzlich ein Markerfragment definierter Größe gegeben, anhand dessen die 2100 Expert Software die Größe der RNA-Fragmente von Größenstandard und Proben zuordnen kann. Der Chip wurde abschließend für eine Minute bei 2400 rpm geschüttelt und in den Bioanalyzer eingesetzt.

Die 2100 Expert Software gibt nach Abschluss eines Chip-Laufs ein Gel-ähnliches Bild sowie die Elektropherogramme der Auftrennung der einzelnen Proben aus. Anhand charakteristischer Merkmale des Elektropherogramms berechnet die Software die *RNA integrity number* (RIN). Mit Hilfe des Gel-ähnlichen Bildes und des RIN-Wertes kann eine mögliche Degradation der RNA beurteilt werden.

3.3 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription (*Reverse transcription quantitative real-time PCR*, RT-qPCR)

Die qPCR (*quantitative real-time PCR* – quantitative Echtzeit PCR) ist eine Methode, die auf der 1986 von K.B. Mullis entwickelten Technik der PCR (*polymerase chain reaction* – Polymerase-Kettenreaktion) basiert [133] (siehe Kapitel 3.5.1). Die Amplifikation der Produkte, zumeist DNA, kann mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit am Ende jedes Amplifikationszyklus erfasst werden. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green interkaliert unspezifisch in doppelsträngige Nukleinsäuren. Je größer die Menge der durch eine Polymerase synthetisierten Amplifikate, desto stärker ist das messbare Fluoreszenzsignal. Die qPCR verläuft wie die klassische PCR in drei Zyklen. Zunächst wird die DNA durch Erhitzung denaturiert, darauf folgt die Anlagerung der spezifischen Oligonukleotide (*Primer*) an die einzelsträngige DNA (*Annealing*) und anschließend wird während der Elongation durch eine *Taq* DNA-Polymerase der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die qPCR zur Detektion von miRNAs in Gesamt-RNA isoliert aus Meningeom-Tumorgewebe (siehe Kapitel 3.2.1) verwendet. Da hierfür die Gesamt-RNA zunächst in cDNA (*complementary DNA*) revers transkribiert wird, wird das gesamte Experiment als RT-qPCR bezeichnet. Außerdem wurde mittels der RT-qPCR die erfolgreiche ektopische Überexpression der miR-34a-3p in HEK293T Zellen überprüft.

3.3.1 Reverse Transkription von Gesamt-RNA in cDNA

Die reverse Transkription isolierter Gesamt-RNA zu cDNA wurde mit Hilfe des miScript II RT Kit (Qiagen) durchgeführt. Dieser Kit beinhaltet das Enzym „Reverse Transkriptase“, ein Nukleotidgemisch (Nucleics Mix) sowie einen Reaktionspuffer (HiSpec Buffer). Der verwendete HiSpec-Puffer unterstützt die effektive reverse Transkription von miRNAs zu cDNA. Abhängig vom Patientenkollektiv (siehe Tabelle 7 Kapitel 3.1.10) wurden 500 ng (Set 1) oder 200 ng (Set 2) Gesamt-RNA in der reversen Transkription eingesetzt. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA isoliert aus HEK293T Zellen wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

Der Ansatz wurde dabei nach folgendem Schema pipettiert:

Ansatz:

200/500 ng RNA-Template
4 µl miScript HiSpec Buffer
2 µl Nucleics Mix
2 µl Reverse Transcriptase Mix
ad 20 µl H₂O RNase-free

Die reverse Transkription wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und abschließend das Enzym bei 95 °C für 5 min hitzeinaktiviert.

3.3.2 RT-qPCR zur Detektion von miRNAs

Zur Detektion von miRNA-Sequenzen in der cDNA mittels RT-qPCR wurde der miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) mit den in Kapitel 3.1.7 aufgeführten miScript Primer Assays verwendet. Die RT-qPCR wurde für jeden Ansatz im Duplikat durchgeführt, als endogene Kontrolle wurde die RNU6B verwendet. Der miScript SYBR® Green PCR Kit arbeitet mit einer sogenannten Hot-Start *Taq* DNA-Polymerase. Aus diesem Grund beginnt das Programm mit einem 15 minütigen Inkubationsschritt bei 95 °C zur Aktivierung des Enzyms. Während der reversen Transkription der Gesamt-RNA zu cDNA werden an diese Bindestellen für einen im miScript SYBR® Green PCR Kit enthaltenen Universalprimer ligiert. Der Ansatz der RT-qPCR und die Durchführung im StepOnePlus™ Real-Time PCR System erfolgten dabei nach folgendem Schema basierend auf dem Herstellerprotokoll:

qPCR-Ansatz:

2 ng cDNA-Template
5 µl 2x QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix
1 µl 10x miScript Universal Primer
1 µl 10x miScript Primer Assay
ad 10 µl H₂O RNase-free

Programm:

15 min	95 °C	
15 s	94 °C	40 Zyklen
30 s	55 °C	
30 s	70 °C	

Nach Abschluss der RT-qPCR wurden die C_q(cycle threshold)-Rohwerte für alle Proben zur weiteren Auswertung in Microsoft Excel exportiert. Der C_q-Wert liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikation während der RT-qPCR.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultur und Lagerung eukaryotischer Zellen

Kultivierung eukaryotischer Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei adhärent wachsende eukaryotische Zelllinien verwendet.

Die Zelllinie Ben-Men-1 wurde aus einem meningoethelialen Meningeom nach operativer Entfernung etabliert [134]. Hierzu wurde das Gen für die humane reverse Transkriptase der Telomerase (hTERT) durch retrovirale Transduktion stabil in die Zellen eingebracht, was zu einer Immortalisierung der Zellen und somit unbegrenztem Wachstum in der Zellkultur führt [134].

Bei der Zelllinie HEK293T handelt es sich um embryonale Nierenzellen. Diese Zellen wurden durch Exposition mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5, von denen sich Teile stabil in das Genom der Zellen integriert haben, immortalisiert [135]. HEK293T ist eine Variante dieser ursprünglichen Zelllinie, die das SV40 Large T-Antigen konstitutiv exprimiert. Dies erlaubt eine starke Expression von Sequenzen transfizierter Plasmide, die einen SV40 Promotor besitzen [136]. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide pMIR-RNL-TK und pSG5 (siehe Kapitel 3.1.5) besitzen beide einen solchen Promotor.

Beide Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), dass mit 10 % fötalem Kälberserum (*fetal calf serum* - FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt wurde, kultiviert. Vor Zugabe zum Nährmedium wurde das FCS bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert. Die Stammkultur erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen mit Filterdeckel im Brutschrank bei 37 °C, etwa 80 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Partialdruck. Alle Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Beide Zelllinien wurden zur Aufrechterhaltung der Stammkultur mindestens zweimal wöchentlich subkultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte, wenn die Zellen eine Konfluenz von etwa 90 % erreicht hatten. Nachdem das Kulturmedium abgenommen wurde, wurden die Zellen mit 5 ml sterilem 1x DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) gewaschen. Das DPBS wurde abgenommen und die Zellen zum Ablösen vom Boden der Zellkulturflasche mit 1 ml Trypsin/EDTA überschichtet. Die Zellkulturflaschen wurden für 2 bis 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Trypsin spaltet proteolytisch die Verbindungen der Zellen zum Flaschenboden und EDTA komplexiert die zur Zelladhäsion benötigten Ca²⁺-Ionen. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:20 bis 1:40 für HEK293T und 1:5 bis 1:10 für Ben-Men-1 in eine neue Zellkulturflasche mit 15 ml frischem Kulturmedium überführt. Im Zellkulturmedium enthaltene Serumproteine des FCS

inaktivieren Trypsin und die Zellen können nach der Passagierung erneut am Flaschenboden adhären.

Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Einfriermedium:

70 % (v/v) DMEM

20 % (v/v) FCS

10 % (v/v) DMSO

Zur Langzeitlagerung können eukaryotische Zellen bei - 196 °C in flüssigem Stickstoff asserviert werden. Das hierfür verwendete Einfriermedium enthält Dimethylsulfoxid (DMSO). Diese Substanz wirkt bei RT toxisch auf die Zellen, verhindert aber während des Einfriervorgangs die Bildung von Eiskristallen im Zelllumen, die zur Zerstörung der Zellwände führen würden. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben vom Flaschenboden abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 300 x g pelletiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in Einfriermedium resuspendiert und zu je 1 ml in Kryogefäßen aliquotiert. Die Zellen wurden in der CoolCell™ bei - 80 °C mit einer konstanten Abkühlrate von 1 °C pro Minute eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff asserviert.

Auftauen kryokonservierter Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in Kulturmedium in einem Zentrifugenröhrchen aufgenommen, was zu einer raschen Verdünnung des bei RT toxischen DMSO führt. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 300 x g pelletiert und der DMSO-haltige Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt.

3.4.2 Zellzählung mittels eines automatischen Zellzählgerätes

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde ein automatisches Zellzählgerät (Luna™ fl) verwendet. Das Gerät besitzt eine Kamera, welche die Gesamtanzahl an Zellen in einer definierten Fläche eines Counting-Slides ermittelt. Der Counting-Slide besitzt Kammern definierter Größe und Höhe, in die die Zellsuspension eingebracht wird. Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurden 11 µl der Suspension in die Kammer eines Counting-Slides pipettiert und dieser in das Gerät eingesetzt. Aufgrund des durch die Größe und Höhe der Kammer definierten Volumens, in dem die Gesamtzellzahl bestimmt wird, kann das Gerät automatisch die Zellzahl pro ml Zellsuspension berechnen.

3.4.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293T mittels PolyFect

Das PolyFect Transfektionsreagenz ist eine Mischung aus aktiven Dendrimeren. Diese bilden eine sphärische Struktur, an deren Enden sich positiv geladene Aminogruppen befinden, an die die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren binden. Nach Bindung von Nukleinsäuren an die Dendrimere bildet sich eine kompakte Struktur, die sich an die Oberfläche der Zellen anlagert und durch unspezifische Endozytose von den Zellen aufgenommen wird.

Die HEK293T Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in der gewünschten Zelldichte ausgesät. In jedem Transfektionsansatz wurde zunächst die entsprechende Menge Plasmid-DNA in DMEM aufgenommen und dann das PolyFect Transfektionsreagenz zugegeben. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt und für 5 bis 10 min bei RT inkubiert, in dieser Zeit bilden sich die zuvor beschriebenen Dendrimer-DNA Komplexe. Der Ansatz wurde vorsichtig tropfenweise zu den Zellen gegeben. Der Dual-Luciferase® Reporter Assay wurde in 24-Well Zellkulturplatten durchgeführt, die Transfektion zur ektopischen Überexpression der miR-34a-3p in HEK293T Zellen in 10 cm Zellkulturschalen. Die Transfektionsansätze wurden nach dem Schema in Tabelle 8 angesetzt.

Tabelle 8: Pipettierschema der Transfektionsansätze für die Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293T Zellen.

Schale	Plasmid	Plasmid-Menge [µg]	DMEM [µl]	Polyfect [µl]
Ø 10 cm	pSG5	4	300	25
	pSG5-miR-34a	4		
24 Well	pSG5	0,8	25	2
	pSG5-miR-34a	0,8		
	pMIR-RNL-TK Konstrukt	0,2		

Transfektion von RNA-Oligonukleotiden in Ben-Men-1 mittels HiPerFect

Das HiPerFect Transfektionsreagenz ist eine Mischung aus kationischen und neutralen Lipiden. Diese bilden während einer kurzen Inkubation Komplexe mit RNA-Oligonukleotiden, die von den Zellen unspezifisch durch Endozytose aufgenommen werden.

Die Ben-Men-1 Zellen wurden unmittelbar vor der Transfektion in der gewünschten Zelldichte ausgesät. Für den Transfektionsansatz wurden die RNA-Oligonukleotide (Stammlösung 20 µM) entsprechend der gewünschten Endkonzentration in einem Gemisch aus DMEM und HiPerFect Transfektionsreagenz aufgenommen. Der Transfektionsansatz wurde kurz

geschüttelt, für 5 min bei RT inkubiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Alle Transfektionsansätze mit RNA-Oligonukleotiden wurden nach dem Schema in Tabelle 9 angesetzt. Die jeweilige Endkonzentration der RNA-Oligonukleotide bezieht sich auf das Gesamt-Endvolumen von 3 ml Kulturmedium nach Zugabe des Transfektionsansatzes in das Well einer 6-Well Zellkulturplatte.

Tabelle 9: Pipettierschema der Transfektionsansätze für die Transfektion von RNA-Oligonukleotiden in Ben-Men-1 Zellen. Die Endkonzentration bezieht sich auf 3 ml Gesamt-Endvolumen im Well einer 6-Well Zellkulturplatte.

RNA-Oligonukleotid	Endkonzentration	Volumen RNA-Oligonukleotid [μ l]	DMEM [μ l]	HiPerFect [μ l]
AllStars Negative Control siRNA	10 nM	1,5	500	20
miR-34a-3p (Mimic)	10 nM	1,5	500	20
miScript Inhibitor Negative Control	100 nM	15	500	20
Anti-miR-34a-3p (Inhibitor)	100 nM	15	500	20

3.4.4 Bestimmung der Proliferationsrate

Um den Einfluss der Deregulation der miR-34a-3p auf die Proliferation der Meningeom-Zelllinie Ben-Men-1 zu untersuchen, wurden die Zellen mit RNA-Oligonukleotiden transfiziert. Hierfür wurden 20.000 Zellen pro Well in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät und am gleichen Tag transfiziert. Alle Transfektionen wurden in Triplikaten mit RNA-Oligonukleotiden und dem HiPerFect Transfektionsreagenz durchgeführt. Außerdem wurden jeweils drei Wells untransfiziert belassen. Die Transfektionsansätze für miR-34a-3p sowie anti-miR-34a-3p und den entsprechenden Kontrollen wurden gemäß dem Schema in Tabelle 9 (siehe Kapitel 3.4.3) angesetzt. Fünf Stunden nach Transfektion wurde das Medium mit verbleibendem Transfektionsreagenz abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Zur Zählung wurden die Zellen nach 72, 96 und 120 Stunden mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturplatten gelöst, in 1 ml Kulturmedium aufgenommen und pro Ansatz in Duplikaten mit dem automatischen Zellzählgerät (siehe Kapitel 3.4.2) gezählt.

3.4.5 Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Apoptose

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) können Zellen einer Zellsuspension aufgrund spezifischer Eigenschaften separiert werden [137]. Die Zellen einer Suspension werden mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung vereinzelt und passieren eine Kapillare, durch die ein Laser verläuft. Beim Passieren des

Lasers können verschiedene Eigenschaften der Zellen detektiert werden. Zu Beginn des Experiments wird zunächst die Zellpopulation aufgrund ihrer Größe und Granularität charakterisiert. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* – FSC) korreliert mit der Größe der Zellen, das Seitwärtsstreulicht (*side scatter* – SSC) resultiert aus der Granularität der Zellen. Durch die Festlegung eines Fensters, in dem sich die Zellpopulation befindet, wird die Messung von Zelldebris vermieden, die eventuell zu unspezifischen Ergebnissen führen könnte. Nach Charakterisierung der gesamten Zellpopulation können Subpopulationen von Zellen, die z.B. mit spezifischen Antikörpern oder Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, durch den Laser erfasst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Deregulation der miR-34a-3p in der Meningeom-Zelllinie Ben-Men-1 verwendet. Hierfür wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) markiert. Annexin V bindet an Phosphatidylserin-Reste auf der Oberfläche der Zellmembran. Bei vitalen Zellen befinden sich Membranlipide mit Phosphatidylserin nur in der inneren Schicht der Plasmamembran. In frühen Stadien der Apoptose kommt es zu einem „Flip“ dieser Lipide in die äußere Schicht der Plasmamembran und damit zur Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und die Membran vitaler Zellen nicht durchdringen kann. In späten Stadien der Apoptose kommt es jedoch zum Verlust der Membranintegrität der Zellen und PI kann in die Zellen eindringen. Im verwendeten Reaktionskit für die Durchflusszytometrie (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor® 488 and Propidiumiodide (PI), Invitrogen/Life Technologies) ist Annexin V mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 gekoppelt. Dieser emittiert nach Anregung durch den Laser grünes Licht, Propidiumiodid emittiert rotes Licht.

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden 1×10^6 Zellen der Meningeom-Zelllinie Ben-Men-1 ausgesät und wie zuvor beschrieben transfiziert (siehe Kapitel 3.4.3). Nach 48 bzw. 72 Stunden wurde das Zellkulturmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA geerntet und hinzugegeben. Die Zellen wurden für 3 min bei $300 \times g$ pelletiert, einmal mit 1x DPBS gewaschen und in 1 ml 1x Annexin-Binding-Buffer, der Bestandteil des verwendeten Kits ist, aufgenommen. Die Zellen wurden für 15 min lichtgeschützt mit 2 μ l Alexa Fluor® 488 Annexin V und 1 μ l PI-Lösung ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt und anschließend im FACS analysiert. Das Experiment wurde unter Anleitung von Frau Ruth Nickels am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, AG Prof. Dr. M. Menger, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, mit Hilfe des „FACScan“ Durchflusszytometers und der Software „CellQuest Pro“ durchgeführt. Die Einordnung der Zellen in das Stadium der Apoptose erfolgte auf Grundlage der detektierten Färbungen mit Alexa Fluor® 488

Annexin V und PI [138]. Vitale Zellen werden von beiden Farbstoffen nicht erfasst. Zellen in der frühen Apoptose sind positiv für Alexa Fluor® 488 Annexin V. Nekrotische Zellen mit komplettem Verlust der Membranintegrität sind nur positiv für PI. Zellen, die positiv für Alexa Fluor® 488 Annexin V und PI sind, befinden sich in der späten Apoptose oder Nekrose [138].

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* – PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* – PCR) ermöglicht die *in vitro* Amplifikation von DNA [133]. Als Ausgangsprodukt (*Template*) können in der PCR sowohl genomische DNA als auch Plasmid-DNA eingesetzt werden. Die PCR wird in drei Schritten, die mehrfach hintereinander in einem Thermocycler ablaufen, durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA-Doppelstränge, im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung spezifischer Oligonukleotide (*Primer*) an ihre komplementäre Sequenz der Einzelstränge (*Annealing*). In der anschließenden Elongation synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend vom freien 3'-Hydroxy-Ende des Primers, aus freien dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) im PCR-Ansatz den komplementären Einzelstrang. In allen PCR-Reaktionen wurde die *Taq* DNA-Polymerase verwendet, ein Enzym, das aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Die Temperatur im Annealing Schritt richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer. Während der Elongation wird eine Temperatur von 72 °C verwendet, dies ist das Temperaturoptimum der *Taq* DNA-Polymerase.

PCR-Amplifikation von 3'UTR-Sequenzen aus humaner cDNA

Zur Klonierung von 3'UTR Bereichen potentieller Zielgene wurden diese zunächst aus humaner cDNA mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 2 Kapitel 3.1.6) amplifiziert.

Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Ansatz:

- 100 ng cDNA-Template
- 1 µl Vorwärtsprimer (25 µM)
- 1 µl Rückwärtsprimer (25 µM)
- 2 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM)
- 5 µl 10x *Taq*-Buffer
- 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)
- ad 50 µl H₂O_{dd}

Programm:

3 min	95 °C	
50 s	95 °C	
1 min	57 °C	38 Zyklen
X s	72 °C	
Y min	72 °C	

Die Elongationszeit (X) richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments (siehe Tabelle 3 Kapitel 3.1.6). Als Grundlage wird hierbei eine Syntheserate von 1000 bp pro 1 min für die *Taq* DNA-Polymerase angenommen. Die Zeit für die finale Elongation (Y) betrug mindestens das Doppelte der verwendeten Elongationszeit während der Zyklen.

Colony-PCR

Die Colony-PCR wird verwendet, um die erfolgreiche Insertion eines Fremd-DNA Fragments in einen Vektor zu überprüfen. Als Ausgangsmaterial dient in der Colony-PCR eine einzelne Bakterienkolonie, die nach Transformation der Bakterien auf einer LB-Agarplatte (*lysogeny broth*) gewachsen ist (siehe Kapitel 3.6.3). Alle Colony-PCRs für den Vektor pMIR-RNL-TK wurden mit den Primern pMIR-RNL-TK for und pMIR-RNL-TK rev (siehe Tabelle 2 Kapitel 3.1.6) nach folgendem Schema durchgeführt.

Ansatz:

1	gepickte Kolonie
0,5 µl	Vorwärtsprimer (25 µM)
0,5 µl	Rückwärtsprimer (25 µM)
1 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
2,5 µl	10x <i>Taq</i> -Buffer
0,2 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 25 µl	H ₂ O _{dd}

Programm:

5 min	95 °C	
50 s	95 °C	
1 min	57 °C	30 Zyklen
X s	72 °C	
Y min	72 °C	

Auch bei der Colony-PCR sind die Elongationszeit (X) und die Zeit der finalen Elongation (Y) abhängig von der Größe des amplifizierten DNA-Fragments. Durch die verwendeten Primer

ist das erwartete PCR-Produkt bei erfolgreicher Insertion des 3'UTR-Fragments etwa 200 bp größer als dieses Fragment im Vektor (siehe Tabelle 3 Kapitel 3.1.6). Im ersten Denaturierungsschritt werden die im Ansatz enthaltenen Bakterien zerstört und die Plasmid-DNA liegt frei für die Amplifikation in der Lösung vor.

Zielgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA (Overlap-Extension PCR)

Zur zielgerichteten Mutagenese potentieller Bindestellen für miR-34a-3p in 3'UTR Sequenzen wurde das Verfahren der Overlap-Extension PCR verwendet. Die potentiellen Bindestellen wurden dabei gegen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen ausgetauscht (siehe Tabelle 3 Kapitel 3.1.6). Die Mutagenese wurde in zwei Schritten durchgeführt. Als Ausgangsprodukt diente hierbei der pMIR-RNL-TK Vektor, in den das 3'UTR Fragment zuvor kloniert wurde. In der ersten PCR-Reaktion wurde eine Kombination aus vier verschiedenen Primern verwendet (siehe Tabellen 2 und 3 Kapitel 3.1.6). Der jeweilige Mutagenese-Primer überspannt dabei die potentielle Bindestelle und ist jeweils nur 5' und 3' von diesem Bereich komplementär zum Ausgangsfragment. Diese Primer wurden jeweils in Kombination mit den ursprünglich zur Klonierung verwendeten Primern eingesetzt. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden die entstandenen Fragmente 1 und 2 aus den ersten beiden PCR-Reaktionen eingesetzt, die zuvor mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5.2) aufgetrennt und aufgereinigt (siehe Kapitel 3.5.3) wurden. Die beiden Einzelfragmente sind im Bereich der Mutagenese-Primer komplementär und lagern sich aneinander an. Die DNA-Polymerase synthetisiert, ausgehend von den Klonierungsprimern, die komplementären DNA-Stränge (Overlap-Extension) und es entsteht erneut ein Doppelstrang. Als Produkt dieser PCR-Reaktion erhält man das vollständige 3'UTR Fragment mit mutierter Bindestelle.

Die PCR-Reaktionen wurden nach folgenden Schemata durchgeführt:

Ansätze PCR 1:

Fragment 1

- 100 ng Plasmid-DNA
- 1 µl Vorwärtsprimer Klonierung (25 µM)
- 1 µl Rückwärtsprimer Mutagenese (25 µM)
- 2 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM)
- 5 µl 10x *Taq*-Buffer
- 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)
- ad 50 µl H₂O_{dd}

Fragment 2

100 ng Plasmid-DNA
1 µl Vorwärtsprimer Mutagenese (25 µM)
1 µl Rückwärtsprimer Klonierung (25 µM)
2 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM)
5 µl 10x *Taq*-Buffer
0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H₂O_{dd}

Ansatz PCR 2:

je 5 µl aufgereinigtes Fragment 1 und 2
1 µl Vorwärtsprimer Klonierung (25 µM)
1 µl Rückwärtsprimer Klonierung (25 µM)
2 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM)
5 µl 10x *Taq*-Buffer
0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H₂O_{dd}

Programm:

3 min	95 °C	
50 s	95 °C	
1 min	57 °C	
X s	72 °C	
Y min	72 °C	
		38 Zyklen

Die Elongationszeit (X) sowie die Zeit für die finale Elongation (Y) sind auch hier abhängig von der Größe der zu amplifizierenden Fragmente. Die Zeit wurde immer entsprechend dem größten zu erwartenden Fragment gewählt.

3.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer:

1 M Eisessig
50 mM EDTA
2 M Tris-HCl, pH 8,0

10x DNA-Ladepuffer:

10 % (v/v) 10x TAE-Laufpuffer
70 % (v/v) Glycerin
20 % (v/v) 20 mM EDTA, pH 8,0
Bromphenolblau
Xylencyanol

Die Auftrennung der PCR-Produkte zur Überprüfung der korrekten Fragmentgröße wurde mittels der Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente bewegen sich nach Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Laufstrecke ist dabei abhängig von der Größe der Fragmente. Große Fragmente passieren das molekulare Sieb, das durch die Agarose entsteht, langsamer.

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde ein 1 – 2 % Agarosegel in 1x TAE-Puffer verwendet. Ein höherer Agarosegehalt führt zu einer besseren Auftrennung kleiner DNA-Fragmente.

Zur Herstellung des Gels wurde eine entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer durch aufkochen gelöst. Vor der Polymerisierung wurde das Agarosegel mit 2 bis 5 µl Ethidiumbromid ($10 \text{ mg}/\mu\text{l}$) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelstränge und kann in ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden.

3.5.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA bindet dabei, abhängig von der Salzkonzentration und dem pH-Wert, an eine Silica-Membran in der Säule. Verunreinigungen werden in einem Waschschrift entfernt und die DNA abschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ von der Säule eluiert.

3.5.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA wurde, analog der Konzentrationsbestimmung von RNA (siehe Kapitel 3.2.2), mit dem NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer durchgeführt. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht dabei 50 µg dsDNA/ml.

3.5.5 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage DNA-Stränge an spezifischen Stellen durch Spaltung von Phosphodiesterbindungen einzelner Nukleotide zu trennen. Jede Restriktionsendonuklease besitzt eine charakteristische Erkennungssequenz in der DNA. Diese Sequenzen sind zumeist Palindrome. Die Spaltung der DNA-Stränge erfolgt entweder glatt (*blunt end*) oder mit Überhängen (*sticky end*). Um eine gerichtete Klonierung der amplifizierten 3'UTR Fragmente in den pMIR-RNL-TK Vektor zu erreichen, wurden jeweils zwei verschiedene Restriktionsenzyme, die unterschiedliche Überhänge bilden, verwendet. Durch entsprechendes Design der Primer (siehe Tabelle 2 Kapitel 3.1.6) wurden diese bereits bei der Synthese mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen.

Alle amplifizierten und aus dem Agarosegel aufgereinigten 3'UTR Fragmente (Insert) und der Zielvektor pMIR-RNL-TK wurden nach folgendem Schema mit Restriktionsenzymen verdaut:

Ansätze:

3' UTR Fragmente (Insert)

- 16 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1 µl *SpeI*-HF®
- 1 µl *SacI*-HF®
- 2 µl Cut-Smart Buffer (10x)

pMIR-RNL-TK

- 2 µl pMIR-RNL-TK Vektor (1 µg/µl)
- 1 µl *SpeI*-HF®
- 1 µl *SacI*-HF®
- 1 µl rAPid Alkaline Phosphatase
- 2 µl Cut-Smart Buffer (10x)

Der Verdau wurde für 1 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden alle Enzyme für 20 min bei 80 °C hitzeinaktiviert. Für die Klonierung der *BCL2* 3'UTR wurde statt dem Enzym *SacI* das Enzym *NgoMVI* verwendet, da sich in der klonierten Sequenz eine Schnittstelle für *SacI* befand.

Im Verdau von pMIR-RNL-TK wurde die rAPid Alkaline Phosphatase zur Dephosphorylierung der freien 5' Enden der Plasmid-DNA eingesetzt. Dies verhindert eine Religation zur zirkulären Struktur der Plasmid-DNA. Der Verdau von 3'UTR Fragmenten und pMIR-RNL-TK wurde anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

3.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die amplifizierten 3'UTR Fragmente und die linearisierte Vektor-DNA, die mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut wurden (siehe Kapitel 3.5.6), können durch eine Ligase an den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen zu einem zirkulären Plasmid verknüpft werden. Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden die DNA-Stränge mit einem *sticky end*, dies verbessert die Anlagerung der DNA-Fragmente an die Plasmid-DNA.

Die Ligation wurde nach folgendem Schema angesetzt:

Ansatz:

6 - 7 µl	verdautes PCR-Produkt (Insert)
1 - 2 µl	Vektor-DNA
1 µl	T4 DNA-Ligase
1 µl	Ligase-Buffer
<hr/>	
10 µl	Gesamtvolumen

Der Ligationsansatz wurde ü.N. bei 4 °C inkubiert. Für die Transformation kompetenter Bakterien (siehe Kapitel 3.6.3) wurden jeweils 5 µl eines Ligationsansatzes eingesetzt. Als Kontrolle für die erfolgreiche Dephosphorylierung der Vektor-DNA wurde ein Ligationsansatz mit H₂O_{dd} statt eines Insert als Kontrolle mitgeführt.

3.5.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Von transformierten Bakterienkolonien, bei denen in der Colony-PCR ein Insert in passender Größe nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.5.1), wurde eine Über-Nacht-Kultur in 50 ml LB-Medium (*lysogeny broth*) angelegt. Nach Isolation der Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.6.4) wurde diese zur Sequenzierung an die Firma Seq-It GmbH (Kaiserslautern) gesendet, die dazu die Methode nach Sanger *et al.* [139] verwendet. Zur Sequenzierung wurden die Primer pMIR-RNL-TK for und rev (siehe Tabelle 2 Kapitel 3.1.6) verwendet, die im flankierenden Bereich des zu sequenzierenden Inserts an die Plasmid-DNA binden. Bei der Sanger-Sequenzierung werden dem Ansatz neben Desoxynukleotiden (dTNP)s auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP)s zugegeben. Aufgrund einer fehlenden 3'-Hydroxygruppe an der Ribose stoppt die Synthese der DNA-Polymerase, da keine neuen Nukleotide mehr an den DNA-Strang geknüpft werden können. Die Anwesenheit eines Inserts mit korrekter Größe und, im Falle einer Mutagenese der Austausch der potentiellen Bindestelle für miR-34a-3p durch eine Restriktionsenzym-Schnittstelle, wurden in den Chromatogrammen mit der Software FinchTV überprüft.

3.6 Mikrobiologische Methoden

3.6.1 Kultur und Lagerung von Bakterien

LB-Medium:

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
1 % (w/v) NaCl
→ autoklavieren

LB-Agar:

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
1 % (w/v) NaCl
1,5 % (w/v) Bacto-Agar
→ autoklavieren

Für die Amplifikation der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurde der Bakterienstamm *Library Efficiency® Escherichia coli* DH5 α TM (Invitrogen; Genotyp: F⁻ Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ ⁻) verwendet. Zur Selektionierung plasmidtragender Bakterien (siehe auch Kapitel 3.1.5) wurden flüssiges LB-Medium (*lysogeny broth*) und LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/_{ml}) versetzt. Zur Plasmidisolierung wurden 50 ml LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. aerob bei 37 °C und 225 rpm in einem Schüttelinkubator kultiviert (Über-Nacht-Kultur). Zur Gewinnung einzelner Kolonien wurden Transformationsansätze (siehe Kapitel 3.6.3) auf einer LB-Agarplatte ausplattiert und diese ü.N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Lagerung von Plasmiden wurden 500 μ l flüssige Bakterienkultur mit 100 μ l DMSO versetzt und bei - 70 °C eingefroren.

Zelldichtebestimmung einer Bakterienkultur

Bei einer Wellenlänge von 600 nm kann die optische Dichte einer Bakterienkultur mit einem Photometer bestimmt werden (OD₆₀₀). Als Referenz diente dabei unbewachsenes Kulturmedium und in einer zweiten Küvette wurde entsprechend 1 ml Bakterienkultur gemessen. Die Berechnung der Dichte basiert auf dem Lambert-Beerschen Gesetz.

Lambert-Beersches Gesetz:

$$E = \log(I_0/I) = \epsilon \times c \times d$$

hierbei gilt:

E = Extinktion (OD)

I_0 = Intensität des einfallenden Lichts

I = Intensität des transmittierten Lichts

ϵ = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient [$1/(\text{mol} \cdot \text{cm})$]

d = Schichtdicke der Probe [cm]

c = molare Konzentration der absorbierenden Substanz [mol/l]

3.6.2 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* DH5 α

TfBI:

30 mM KOAc

50 mM MnCl₂

100 mM KCl

10 mM CaCl₂

15 % (v/v) Glycerin

→ sterilfiltrieren (0,2 μ M)

TfBII:

10 mM Na(MOPS)

75 mM CaCl₂

10 mM KCl

15 % (v/v) Glycerin

→ sterilfiltrieren (0,2 μ M)

SOB-Medium:

2% (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt

10 mM MgCl₂

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

→ autoklavieren

SOC-Medium:

SOB-Medium

20 mM Glucose

→ sterilfiltrieren (0,2 μ M)

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA während der Transformation (siehe Kapitel 3.6.3) müssen Bakterien kompetent gemacht werden. Dies wurde mit Hilfe der Calciumchlorid-Methode durchgeführt. Ein Überschuss von Chloridionen führt zur Permeabilisierung der bakteriellen Zellwände. Eine Über-Nacht-Kultur mit 5 ml LB-Medium wurde in 500 ml SOB-Medium überführt. Diese Bakteriensuspension wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C und 225 rpm kultiviert. Nach Abkühlung der Bakterienkultur auf Eis wurde diese für 15 min bei 4000 x g und 4 °C pelletiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 100 ml kaltem TfBI

resuspendiert und die Bakterien für 8 min bei 4000 x g und 4 °C pelletiert. Nach Resuspendierung des Pellets in 20 ml kaltem TfBII wurden die Bakterien in Kryogefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 70 °C gelagert.

3.6.3 Transformation von *Escherichia coli* DH5α

Die Transformation ligierter Plasmide in kompetente Bakterien erfolgte durch eine Hitzeschockbehandlung. Durch die starke Temperaturerhöhung kommt es kurzfristig zu einer stärkeren Permeabilisierung der Bakterienzellwand und die Aufnahmefähigkeit der Bakterien für Plasmid-DNA wird erhöht.

Je 5 µl eines Ligationsansatzes (siehe Kapitel 3.5.6) wurden zu 50 µl kompetenten Bakterien gegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit lagern sich die Plasmide an die Bakterienzellwände an. Der Ansatz wurde anschließend für 90 sek bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und für weitere 2 min auf Eis abgekühlt. Es wurden 100 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 1 h bei 37 °C und 225 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Nach der Transformation und erfolgreichem Nachweis eines Inserts korrekter Größe in der Colony-PCR wurde von dieser Bakterienkolonie zur Plasmidisolierung eine Über-Nacht-Kultur in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft. In dieser Kultur können sich nur Bakterien, die das entsprechende Plasmid tragen und somit über eine Ampicillinresistenz verfügen, vermehren. Vor der Isolierung wurden 500 µl der Bakterien aus der Kultur entnommen, mit 100 µl DMSO versetzt und bei - 70 °C gelagert. Die Bakterienkultur wurde für 15 min bei 6000 x g und RT pelletiert und die Isolierung der Plasmide nach Anleitung des Herstellers mit dem NucleoBond® PC100 Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. Das Prinzip der Aufreinigung besteht aus einer alkalischen Lyse der Bakterien und der anschließenden Reinigung der Plasmid-DNA, die bei entsprechender Salzkonzentration und pH-Wert an eine Matrix in einer Säule gebunden bleibt. Nach Durchführung der Reinigungsschritte wurde die Plasmid-DNA von der Säule eluiert und die Plasmid-Konzentration gemessen (siehe Kapitel 3.5.4). Die so aufgereinigten Plasmide konnten zur Transfektion in der Zellkultur (siehe Kapitel 3.4.3) eingesetzt werden.

3.7 Dual-Luciferase® Reporter Assay

Mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (Promega) wurden in der vorliegenden Arbeit mögliche regulatorische Effekte der miR-34a-3p auf die 3'UTR potentieller Zielgene untersucht. Die Grundlage des Assays beruht auf der Fähigkeit von Luciferasen nach Umsetzung ihres Substrats Licht in Form eines Photons, das mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden kann, zu emittieren. Im Dual-Luciferase® Reporter Assay kann die Aktivität der Firefly- sowie der Renilla-Luciferase gleichzeitig gemessen werden. Zu einem Zellextrakt wird zunächst das spezifische Substrat der Firefly-Luciferase, Luciferin, hinzugegeben. Dieses wird mit Hilfe von Mg^{2+} -Ionen zu Oxyluciferin umgesetzt, dessen Lichtemission im Luminometer gemessen werden kann. Anschließend wird die „Stop&Glo“-Lösung hinzugegeben, welche die Aktivität der Firefly-Luciferase nahezu vollständig unterdrückt und Coelenterazine, das Substrat der Renilla-Luciferase, enthält. Dieses wird von der Renilla-Luciferase zu Coelenteramide umgesetzt, was wiederum zu einer im Luminometer messbaren Lichtemission führt.

Für alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Dual-Luciferase® Reporter Assays wurde der Vektor pMIR-RNL-TK verwendet. Die zu untersuchenden 3'UTR Bereiche wurden jeweils hinter das Firefly-Luciferase Gen kloniert (siehe Tabelle 3 Kapitel 3.1.6, Abschnitt 3.5). Mögliche regulatorische Effekte in dieser 3'UTR durch miR-34a-3p führen zu einer Reduktion der Aktivität der Firefly-Luciferase, relativ zur Aktivität der ebenfalls vom Plasmid exprimierten Renilla-Luciferase, da diese stets unabhängig von der 3'UTR exprimiert wird.

Zur Durchführung des Dual-Luciferase® Reporter Assays wurden $0,4 \times 10^5$ Zellen der Zelllinie HEK293T in 24-Well Platten ausgesät und am Folgetag mit jeweils 0,8 µg des pSG5-miR-34a Expressionsvektors (siehe Kapitel 3.1.5) und 0,2 µg des entsprechenden pMIR-RNL-TK Konstrukts (siehe Tabelle 3 Kapitel 3.1.6) transfiziert (siehe Kapitel 3.4.3). Als Referenz diente eine Kotransfektion des leeren pSG5 Vektors mit dem pMIR-RNL-TK Konstrukt und als Kontrolle eine Kotransfektion der pSG5 Vektoren mit dem leeren pMIR-RNL-TK Vektor. Nach 48 h wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen mit 1x DPBS gewaschen und durch Zugabe von 1x PLB (*passive lysis buffer* – Passiv-Lysepuffer) lysiert. Von den Zelllysaten wurde eine 1:100 Verdünnung in 1x PLB hergestellt, die für die Messung der Luciferase-Aktivitäten im Luminometer verwendet wurde. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden jeweils nur 50 µl der entsprechenden Substratlösungen und 10 µl eines Zelllysats für jede Messung verwendet.

Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel durchgeführt. Aus der Aktivität beider Luciferasen wurde der Quotient gebildet. Die Luciferase-Aktivität, der mit dem leeren pSG5 Expressionsvektor transfizierten Ansätze, wurde jeweils auf 100 % gesetzt und

dazu das prozentuale Verhältnis der Luciferase-Aktivität, der Ansätze nach Transfektion mit dem pSG5-miR-34a Expressionsvektor, berechnet.

3.8 Proteinbiochemische Methoden

3.8.1 Gewinnung von Gesamtprotein-Extrakten aus eukaryotischen Zellen

2x Sample-Buffer:

- 130 mM Tris-HCl (pH 6,8)
- 6 % (w/v) SDS
- 10 % (v/v) 3-Mercapto-1,2-propanediol
- 10 % (w/v) Glycerol

Mittels Immunodetektion von Proteinen im Western-Blot sollten die Auswirkungen der Deregulation der miR-34a-3p auf die Proteinmenge potentieller Zielgene untersucht werden. Für die Durchführung der Western-Blots wurden Gesamtprotein-Extrakte unter reduzierenden Bedingungen aus Ben-Men-1 Zellen nach Transfektion gewonnen. Es wurden jeweils $1,2 \times 10^6$ Zellen in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät und direkt anschließend mit miR-34a-3p, anti-miR-34a-3p oder den entsprechenden Kontrollen transfiziert (siehe Kapitel 3.4.3). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion durch Zugabe von Trypsin/EDTA geerntet und für 5 min bei 300 x g pelletiert. Die Zellpellets wurden einmal mit 1x DPBS gewaschen, erneut pelletiert und dann in 2x Sample-Buffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Inkubation für 3 min bei 50 Hz im TissueLyser LT. Die lysierten Zellpellets wurden anschließend für 5 min bei 100 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Verbleibende Zelltrümmer wurden für 5 min bei 12000 x g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand, welcher die Proteine enthält, in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

3.8.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein-Extrakten

Die Messung der Proteinkonzentration in Gesamtprotein-Extrakten wurde photometrisch mittels Bestimmung der Absorption bei 280 nm (A_{280}) durchgeführt. Hierzu wurde eine 1:100 Verdünnung der Gesamtprotein-Extrakte in 0,1 M NaOH hergestellt und die Probe am NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer gemessen. Die aromatischen Ringe der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein sowie Disulfidbrücken zwischen Cysteinen absorbieren

Licht mit 280 nm Wellenlänge. Je höher dieser Wert, desto höher die Proteinkonzentration in der Lösung.

Die Proteinkonzentration der Proben in µg/µl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{6,4}{A_{280}} = 30 \text{ µg Protein}$$

3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

1x Laufpuffer:

25 mM Tris
0,1 % (w/v) SDS
190 mM Glycin

Das Prinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde als Proteintrennverfahren im Jahr 1970 von Lämmli entwickelt [140]. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet in einem konstanten Masse zu Ladung Verhältnis an die hydrophoben Aminosäurereste von Proteinen, und es kommt zur Bildung von SDS-Proteinkomplexen [141]. Diese SDS-Proteinkomplexe sind immer negativ geladen, die Eigenladung der Proteine wird überdeckt. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes bewegen sich die SDS-Proteinkomplexe im elektrischen Feld durch eine Gelmatrix zur Anode.

Die Gelmatrix besteht aus einem Trenngel, dessen Vernetzungsgrad von der Konzentration an Acrylamid und Bisacrylamid beeinflusst wird. Die Gelmatrix funktioniert wie ein Molekularsieb, kleinere Proteine durchlaufen das Sieb schneller als größere. Auf dem Trenngel befindet sich ein Sammelgel, welches zur Aufkonzentrierung der Proben und somit einer besseren Schärfe der erhaltenen Banden führt. Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels werden Acrylamid und Bisacrylamid durch Radikalisierung mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Katalyse von Tetramethylethylendiamin (TEMED) quervernetzt.

Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele wurde nach dem Schema in Tabelle 10 durchgeführt.

Tabelle 10: Pipettierschema zur Herstellung reduzierender SDS-Polyacrylamidgele. Die Mengenangaben beziehen sich auf ein Gel.

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4 %)
H ₂ O _{dd}	1,02 ml	1,44 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	-	250 µl
1 M Tris-HCl, pH 8,8	1,875 ml	
30 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2 ml	266,6 µl
10 % (w/v) SDS	50 µl	20 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	20 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Gesamtvolumen	5 ml	2 ml

Im ersten Schritt wurde der Ansatz für ein Trenngel hergestellt und in eine „Xcell SureLock™“ Mini-Kassette gegossen. Die Gelschicht wurde bis zum Abschluss der Polymerisation mit H₂O_{dd} überschichtet, um eine scharfe und luftblasenfreie Gelfront zu erhalten. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das H₂O_{dd} vollständig abgenommen und die Gelkassette mit dem Sammelgel aufgefüllt. In das Sammelgel wurde ein Kamm mit entsprechend gewünschter Anzahl an Zähnen gesteckt, hierdurch entstehen nach Abschluss der Polymerisation die Taschen zur Beladung mit Proben. Nicht sofort benötigte Gele wurden bei 4 °C in feuchten Papiertüchern gelagert.

Die Elektrophorese wurde in der „Xcell SureLock® Mini-Cell“ Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Gelkassetten wurden in die Kammer eingesetzt und die innere und äußere Kammer mit 1x Laufpuffer gefüllt. Es wurden jeweils 15 µg Gesamtprotein-Extrakt (siehe Kapitel 3.8.1) pro Spur aufgetragen. Durch die Hitzedenaturierung und das mit 2x Sample-Buffer enthaltene 3-Mercapto-1,2-propanediol wurden bereits Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine zerstört. Als Größenstandard wurden 7 µl des *Precision Plus Protein™ Standard Dual Color* aufgetragen. Bis die Proben die Front zwischen Sammelgel und Trenngel erreicht hatten, wurde eine Spannung von 125 V angelegt. Anschließend wurde pro Gel eine Stromstärke von 40 mA eingestellt.

3.8.4 Western-Blot

Die nach der SDS-PAGE im Gel aufgetrennten Proteine können auf einer Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) immobilisiert werden. Zur Übertragung auf die Membran wird die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe ausgenutzt. In einem vertikal zum Gel gerichteten Spannungsfeld werden die Proteine auf die PVDF-Membran übertragen.

Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

1x Transferpuffer:

- 25 mM Tris
- 0,1 % (w/v) SDS
- 190 mM Glycin
- 20 % (v/v) Methanol

Mit Hilfe des „Xcell II™ Blot Module“ wurde der Proteintransfer in der „Xcell SureLock® Mini-Cell“ nach der Nassblot-Methode durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde vor dem Zusammenbau des Nassblots in 100 % Ethanol aktiviert. Der Nassblot wurde in folgender Reihenfolge im „Xcell II™ Blot Module“ aufgebaut:

Aufbau Nassblot:

- | | |
|-------------|----------------------------|
| Kathode (-) | 2 - 3 Schwämme |
| | 2 <i>Whatman</i> ™-Papiere |
| | 1 Polyacrylamidgel |
| | 1 PVDF-Membran |
| | 2 <i>Whatman</i> ™-Papiere |
| Anode (+) | 2 - 3 Schwämme |

Je nach Bedarf können im „Xcell II™ Blot Module“ auch zwei Polyacrylamidgele gleichzeitig auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Das „Xcell II™ Blot Module“ wurde mit Transferpuffer befüllt und die äußere Kammer zur Kühlung mit H₂O_{dd}. Der Proteintransfer wurde abhängig von der Proteingröße für 1,5 bis 2 h bei 30 V durchgeführt.

Immunodetektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran

1x TBS:

- 20 mM Tris
- 137 mM NaCl
- pH 7,6
- autoklavieren

TBS-T:

- TBS
- 0,05 % (v/v) Tween®20

Blocking-Lösung:

- TBS-T
- 5 % (w/v) Milchpulver oder BSA

Nachdem die Proteine auf der PVDF-Membran immobilisiert wurden, wurden zunächst die unspezifischen, nicht besetzten Proteinbindestellen mit Milchpulver oder BSA auf der Membran blockiert. Hierdurch werden unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran vermieden. Die Membran wurde für eine Stunde bei RT in *Blocking*-Lösung auf einem Rollschüttler inkubiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern (siehe Tabelle 6 Kapitel 3.1.9) wurde ü.N. bei 4 °C auf dem Rollschüttler durchgeführt. Die Antikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung in *Blocking*-Lösung verwendet. Für die Antikörper gegen BCL2, FRAT1 und β -Actin wurde eine *Blocking*-Lösung mit Milchpulver verwendet, für den SMAD4 Antikörper eine *Blocking*-Lösung mit BSA.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei RT auf dem Rollschüttler mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 6 Kapitel 3.1.9) in *Blocking*-Lösung inkubiert. Alle verwendeten Sekundärantikörper sind mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Die Membran wurde abschließend für dreimal je 10 min in TBS-T und einmal für 10 min in TBS gewaschen.

Zur Detektion der mit Antikörpern markierten Proteine wurde die Membran für 5 min mit dem SignalFire™ ECL Reagenz inkubiert. Die an die Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert eine Redox-Reaktion, bei der H_2O_2 reduziert und gleichzeitig das im SignalFire™ ECL Reagenz enthaltene Luminol oxidiert wird. Die dabei entstehende Lichtemission (*enhanced chemiluminescence* – ECL) wurde mit Hilfe des ChemiDoc™ Touch Imaging Systems detektiert und als digitales Chemilumineszenzbild dargestellt. Die Quantifizierung der Proteinbanden und Prozessierung der Aufnahmen wurde mit Hilfe der Image Lab™ Software der Firma Bio-Rad durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung und Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA aus Meningeom-Tumorgewebe

4.1.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Meningeom-Tumorgewebe

Aus den asservierten Tumorproben wurden mit dem Mikrotom Kryo-Dünnschnitte angefertigt. Jeweils einer der Dünnschnitte wurde durch den Pathologen PD Dr. Yoo-Jin Kim (Institut für allgemeine und spezielle Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar) begutachtet, um die Klassifizierung der Tumoren nach WHO Grad und histologischem Subtyp zu verifizieren, sowie das Vorhandensein von ausreichend Tumorzellen im Präparat sicherzustellen. Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Tumorgewebe wurde der miRNeasy Mini Kit verwendet.

Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde die RNA-Konzentration am NanoDrop™ 2000 gemessen. Dieser misst von jeder Probe ein komplettes Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 220 bis 350 nm. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil zur reinen Messung der RNA-Konzentration in einem klassischen Photometer bei einer festen Wellenlänge dar, denn das Spektrum lässt Rückschlüsse auf Verunreinigungen der RNA mit Proteinen oder den zur RNA-Isolation verwendeten Chemikalien wie Phenol und Guanidinthiocyanat (GTC) zu. Die Abbildungen 7A und 7B zeigen exemplarisch die Absorptionsspektren zweier aus Meningeom-Tumorgewebe isolierter RNA-Proben.

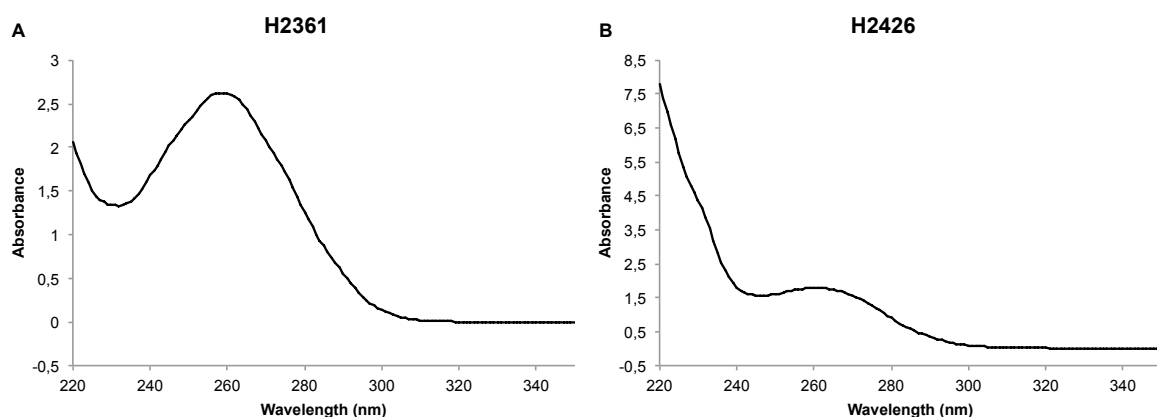


Abbildung 7: Absorptionsspektren aus Meningeom-Tumorgewebe isolierter Gesamt-RNA gemessen mit dem NanoDrop™ 2000. Die Spektren zeigen die Absorptionswerte (Absorbance) gemessen über das Spektrum der Wellenlängen (Wavelength) von 220 bis 350 nm. **(A)** Absorptionsspektrum der Gesamt-RNA isoliert aus Tumor H2361. **(B)** Absorptionsspektrum der Gesamt-RNA isoliert aus Tumor H2426.

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Hier ist bei beiden Spektren ein Maximum zu erkennen. Verunreinigungen der RNA mit Phenol würden zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Kurve von 260 auf 270 nm führen. Dies ist bei beiden Spektren nicht der Fall. Im Spektrum in Abbildung 7B ist zu sehen, dass die Absorptionskurve zunächst, im Vergleich zur Absorptionskurve in Abbildung 7A, von einem sehr hohen Wert abfällt, bevor sie ab einer Wellenlänge von 240 nm wieder ansteigt. Dies ist wahrscheinlich auf eine Verunreinigung der Probe mit GTC zurückzuführen. Verunreinigungen der RNA mit Proteinen wären an einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm zu erkennen. Dies ist bei beiden RNA-Proben nicht der Fall.

Zusätzlich zur Darstellung der Absorptionskurve berechnet die Software des NanoDrop™ 2000 die Quotienten aus dem gemessenen Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 260 nm und den Absorptionswerten bei 280 bzw. 230 nm. Tabelle 11 zeigt die berechneten Quotienten für die isolierte Gesamt-RNA aus Tumor H2361 und H2426.

Tabelle 11: Quotienten der Absorptionswerte der Gesamt-RNA für die Proben H2361 und H2426. Berechnet wurde jeweils der Quotient aus dem Absorptionswert der Probe bei 260 nm und den Absorptionswerten bei 280 bzw. 230 nm.

Probennummer	Quotient 260/280	Quotient 260/230
H2361	2,08	1,95
H2426	2,02	0,4

Diese Quotienten sind ein Maß für die Reinheit einer RNA. Im Idealfall sollte dieser Wert für beide Quotienten zwischen 1,8 und 2 liegen. Für den Quotienten der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm ist das bei beiden Proben der Fall. Wie zuvor schon an den aufgenommenen Absorptionsspektren zu erkennen war, weisen beide Proben somit keine Verunreinigungen mit Proteinen auf.

Für den Quotienten der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 230 nm liegt der Wert für die Probe H2361 im Idealbereich. Dies ist jedoch bei Probe H2426 nicht der Fall, was die Beobachtungen aus dem Absorptionsspektrum bestätigt, dass diese Probe mit Resten von GTC verunreinigt zu sein scheint.

4.1.2 Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA nach Isolation aus Meningeom-Tumorgewebe

Neben der Reinheit der RNA ist auch die Integrität ein wichtiger Faktor für die Durchführung nachfolgender Experimente. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde eine Qualitätskontrolle zur Überprüfung der RNA-Integrität mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt. Dieser überträgt das Prinzip der klassischen Gelelektrophorese auf ein Chip-Format. Jeder Probe wird ein Fluoreszenzfarbstoff beigemischt, der in die RNA interkaliert und nach

Anregung durch einen Laser fluoresziert. Die Intensität der Fluoreszenz wird gemessen und von der 2100 Expert Software in ein Gel-ähnliches Bild sowie in ein Elektropherogramm übertragen. Die Fragmentgrößen werden, wie bei einer klassischen Gelelektrophorese, anhand eines Markers ermittelt.

Die Analyse des Gelbildes und der Elektropherogramme ermöglicht es, die Integrität der isolierten RNA zu beurteilen. Somit kann im Falle einer Degradation der RNA deren Ausmaß abgeschätzt werden, denn diese könnte die Durchführung und die Ergebnisse nachfolgender Experimente, wie Microarrays und RT-qPCR, beeinflussen.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch ein Gelbild des Bioanalyzers für zwölf aus Meningeom-Tumorgewebe isolierte Gesamt-RNAs.

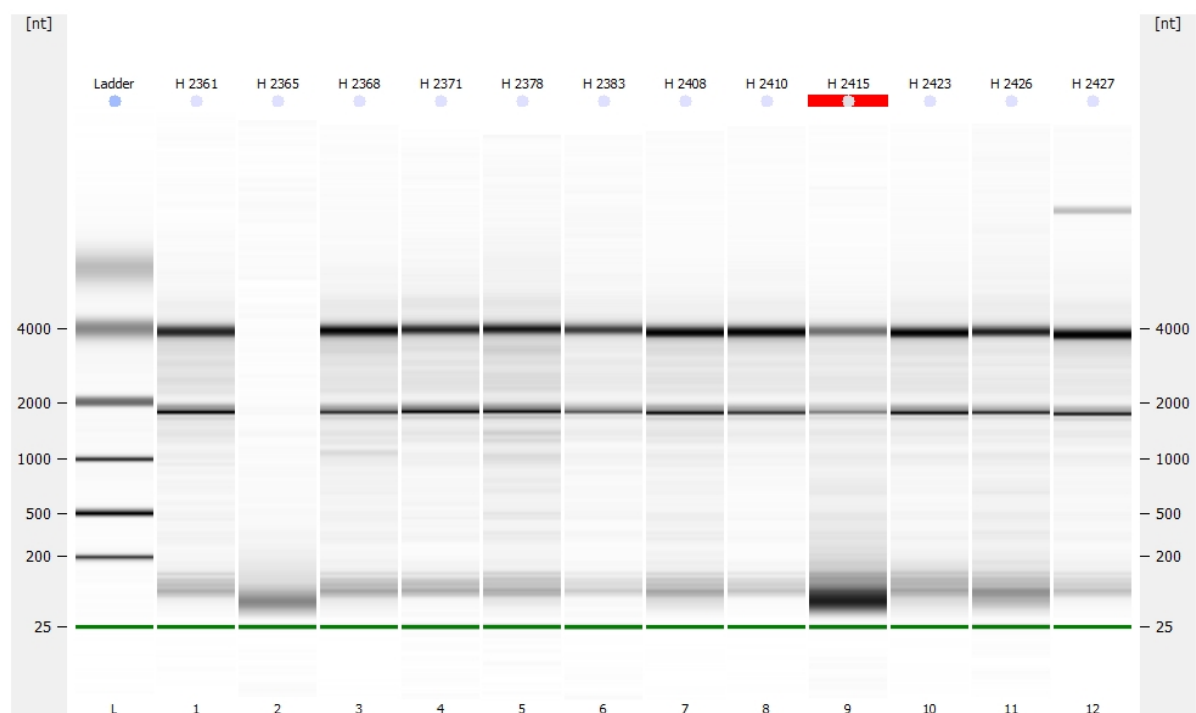


Abbildung 8: Exemplarisches Gelbild nach Auftrennung isolierter Gesamt-RNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer. In Spur L (Ladder) ist der Marker dargestellt, ganz links und rechts sind jeweils die Fragmentgrößen anhand des Markers gekennzeichnet. Die Spuren 1 bis 12 entsprechen jeweils einer RNA-Probe.

Spur 1 mit der Probe H2361 zeigt eine RNA guter Qualität mit wenig Degradation. Die Banden bei etwa 2000 sowie 4000 nt sind deutlich zu erkennen und entsprechen denen der 18S und 28S RNA, zwei ubiquitär vorkommende ribosomale RNAs (rRNA). Die deutlich erkennbare Bande zwischen 25 und 200 nt entspricht der in der Probe enthaltenen Fraktion kleiner RNAs, zu denen auch die miRNAs gehören.

Spur 2 mit der Probe H2365 zeigt eine RNA, in der eine deutliche Degradation zu erkennen ist. Die Banden der 18S und 28S RNA sind nicht mehr vorhanden und es gibt nur eine sichtbare Bande im Bereich der kleinen RNAs.

In Spur 9 mit der Probe H2415 ist eine RNA mit mäßiger Degradation zu sehen. Die Banden der 18S und 28S RNA sind noch erkennbar, aber schwächer als bei Probe H2361 in Spur 1. Abbildung 9 zeigt im Detail das Elektropherogramm der Auftrennung der Proben H2361 und H2365. Hier sind die Unterschiede im Anteil der jeweiligen RNA-Fractionen deutlich zu erkennen.

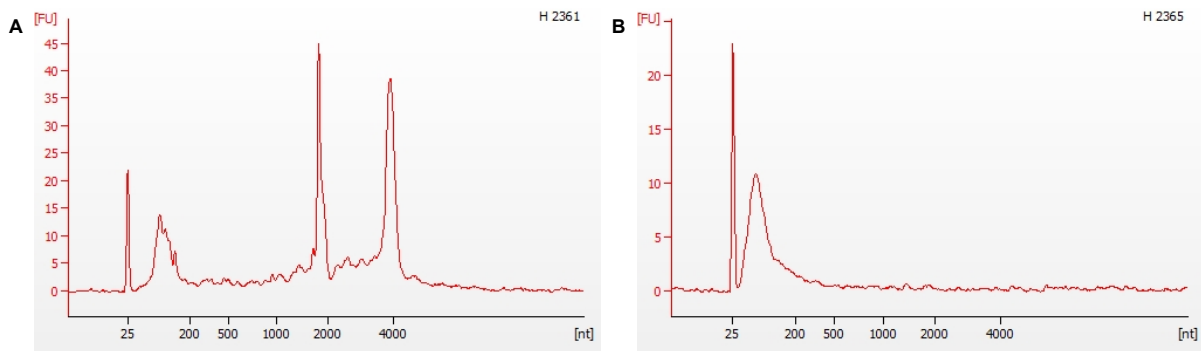


Abbildung 9: Exemplarisches Elektropherogramm für zwei Proben aus dem Gelbild in Abbildung 8. (A) Elektropherogramm der Gesamt-RNA isoliert aus Probe H2361. (B) Elektropherogramm der Gesamt-RNA isoliert aus Probe H2365. Die X-Achse kennzeichnet die Fragmentgrößen [nt]. Auf der Y-Achse sind die Fluoreszenzeinheiten [FU] dargestellt. Je höher dieser Wert, desto mehr RNA der entsprechenden Größe auf der X-Achse ist in der Probe enthalten.

Abbildung 9A zeigt eine RNA mit guter Qualität, während Abbildung 9B eine RNA mit deutlicher Degradation zeigt. Bei beiden Proben erkennt man ein distinktes Maximum bei 25 nt. Hierbei handelt es sich um ein durch den Hersteller zugegebenes Markerfragment, dessen Größe genau bekannt ist. Dieses Maximum entspricht der in grün gekennzeichneten Bande im Gelbild in Abbildung 8.

In Abbildung 9A erkennt man zwischen 25 und 200 nt das Maximum für die Fraktion der kleinen RNAs inklusive der miRNAs. Dieser Bereich des Elektropherogramms wird auch 5S-Region genannt, da sich hier auch die 5S ribosomale RNA (rRNA) befindet. Daran anschließend befindet sich die sogenannte Fast-Region, der Bereich zwischen der 5S-Region und dem 18S rRNA Fragment. Bei 2000 bzw. 4000 nt liegen die Maxima für die 18S und 28S rRNA Fragmente. In Abbildung 9B hingegen ist nur das Maximum zwischen 25 und 200 nt vorhanden und bei 2000 bzw. 4000 nt sind keine Maxima zu erkennen.

Die Software gibt zusätzlich noch die sogenannte *RNA Integrity Number* (RIN) aus. Diese berechnet sich aus charakteristischen Merkmalen des Elektropherogramms [142]. Ein Merkmal ist der Anteil der Fläche unter der Kurve der Maxima der 18S und 28S rRNA im Verhältnis zur Fläche unter der gesamten Kurve. Dies entspricht dem Verhältnis von großen

und kleinen Fragmenten in der Probe. Eine RNA mit wenig Degradation erreicht hierbei den höchsten Wert. Weiterhin wird die Höhe des Maximums der 28S rRNA einbezogen. Eine beginnende Degradation ist am Rückgang dieses Maximums zu erkennen. Der Anteil der Fläche unter der Kurve der Fast-Region gibt ebenfalls Auskunft über die Degradation. Bei zunehmender Degradierung kommt es zum Abbau der 18S und 28S rRNA. Teilweise degradierte Fragmente dieser ribosomalen RNAs werden in der Fast-Region gemessen. Ein letztes Merkmal ist die Höhe der Markerbande bei 25 nt im Verhältnis zur Höhe der anderen Maxima des Elektropherogramms. Ein hoher Wert würde hier bedeuten, dass die 18S und 28S rRNA vollständig degradiert ist und sich die kleinen Fragmente in dieser Region sammeln [142]. Eine RIN von 10 entspricht der besten RNA Integrität, eine RIN von 1 würde vollständige Degradation der RNA bedeuten. Die Probe in Abbildung 9A hat eine RIN von 8,4, dies entspricht einer guten RNA Qualität. Die Probe in Abbildung 9B hingegen hat eine RIN von 2,6, was einer deutlichen Degradation entspricht. Die RIN aller aus Meningeom-Tumorgewebe isolierten Gesamt-RNAs nach Analyse im Agilent 2100 Bioanalyzer findet sich im Anhang in den Tabellen A1 und A2.

4.2 Validierung differentiell exprimierter miRNAs in Meningeomen

4.2.1 Validierung von Microarray-Ergebnissen mittels RT-qPCR

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsprofil von 1205 miRNAs für Meningeome verschiedener WHO Grade und histologischer Subtypen in einem Set von 55 Meningeomen mittels Microarrays erstellt. Dieses Set beinhaltete meningotheliale, fibroblastische, transitionale, atypische und anaplastische Meningeome zu jeweils etwa gleichen Anteilen (siehe Tabelle 7 Kapitel 3.1.10). Es konnten insgesamt 57 miRNAs als differentiell exprimiert identifiziert werden. Die Ergebnisse des miRNA-Expressionsprofils wurden 2015 in Neuro-Oncology veröffentlicht [143].

Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Hierzu wurde die aus dem Tumorgewebe isolierte Gesamt-RNA in cDNA revers transkribiert und anschließend ausgewählte miRNAs mit einem miRNA-spezifischen Primer sowie einem Universalprimer, für den während der reversen Transkription zur cDNA eine Bindestelle an die RNA ligiert wird, in der RT-qPCR mittels SYBR-Green detektiert. Als endogene Kontrolle wurde die RNU6B, eine ubiquitär exprimierte, kleine nukleäre RNA, verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt, und der Mittelwert der Cq Werte der Duplikate wurde zur Berechnung der ΔCq Werte verwendet. Der ΔCq Wert berechnet sich aus der Differenz zwischen dem Cq Wert der jeweiligen miRNA und dem Cq Wert der endogenen Kontrolle RNU6B ($\Delta Cq = \text{Mittelwert Cq (miRNA)} - \text{Mittelwert Cq (RNU6B)}$). Die n-fache differentielle Expression der miRNAs zwischen den jeweils genannten Gruppen wird als Foldchange bezeichnet. Zur Berechnung der Foldchange wurden die Mittelwerte der ΔCq Werte für die jeweiligen Gruppen verwendet. Ob signifikante Expressionsunterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen vorlagen, wurde mit einem t-Test ermittelt.

In einem ersten Schritt wurde die differentielle Expression von zwölf miRNAs im gleichen Patientenkollektiv, das für die Microarrays verwendet wurde, überprüft. Die Ergebnisse dieser Validierung finden sich in den Tabellen 12 und 13. Im Anhang in Tabelle A3 sind alle ΔCq Rohwerte, die zur Berechnung der Foldchange verwendet wurden, aufgeführt.

Tabelle 12 zeigt die Vergleiche zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen der WHO Grad I Meningeome. Verglichen wurde jeweils die differentielle Expression der einzelnen miRNAs nach den Microarray-Ergebnissen mit dem Ergebnis der RT-qPCR für das gleiche Patientenkollektiv, im nachfolgenden als Set 1 bezeichnet.

Tabelle 12: Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels RT-qPCR (Histologische Subtypen).
Es sind jeweils die Ergebnisse als Foldchange für die Vergleiche zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen der WHO Grad I Meningeome gezeigt. Eine negative Foldchange bedeutet eine höhere Expression der miRNA in der zweiten Gruppe, eine positive Foldchange, dass die miRNA in der zweiten Gruppe niedriger exprimiert ist. Signifikante Ergebnisse (t-Test, $P < 0,05$) sind fett gedruckt.

	Meningothelial vs Fibroblastisch		Meningothelial vs Transitional		Fibroblastisch vs Transitional	
	Array Set 1	qPCR Set 1	Array Set 1	qPCR Set 1	Array Set 1	qPCR Set 1
miR-222	-2,552	-5,258	-2,658	-4,130	-1,060	1,273
miR-34a-3p	-1,036	-2,024	-1,705	-2,034	-1,687	-1,005
miR-136	-1,224	-1,610	-1,526	-1,486	-1,256	1,083
miR-376c	-1,324	-2,100	-2,012	-2,242	-1,494	-1,068
miR-195	-3,363	-3,312	-3,088	-2,519	1,098	1,315
miR-497	-4,015	-3,723	-3,621	-3,901	1,087	-1,048
miR-21	-1,185	-1,539	-1,072	-1,496	1,112	1,029
miR-199a-3p	-2,178	-3,558	-1,514	-1,822	1,397	1,953
miR-218	2,812	1,360	2,626	1,731	-1,048	1,273
miR-181a	2,658	1,732	2,255	1,887	-1,195	1,090
miR-101	1,447	-1,765	-1,130	-2,333	-1,644	-1,322
miR-377	-1,318	-3,028	-1,772	-2,028	-1,340	1,493

Die Ergebnisse der RT-qPCR haben eine 3- bis 5-fach signifikant niedrigere Expression, ähnlich den vorliegenden Microarray-Ergebnissen, für miR-222, -195, -497 sowie -199a-3p in meningothelialen Meningeomen im Vergleich zu fibroblastischen Meningeomen, bestätigt. Eine signifikant niedrigere Expression entsprechend den Microarray-Ergebnissen hat sich auch für miR-222, -195 und -497 in meningothelialen Meningeomen im Vergleich zu transitionalen Meningeomen bestätigt. Im Vergleich zwischen fibroblastischen und transitionalen Meningeomen zeigt sich lediglich für miR-199a-3p ein signifikantes Ergebnis mit einer knapp 2-fach niedrigeren Expression in den transitionalen Meningeomen.

Tabelle 13 zeigt die Vergleiche zwischen den verschiedenen WHO Graden der untersuchten Meningeome. Verglichen wurde auch hier jeweils die differentielle Expression der einzelnen miRNAs nach den Microarray-Ergebnissen und dem Ergebnis der RT-qPCR im gleichen Patientenkollektiv (Set 1).

Tabelle 13: Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels RT-qPCR (WHO Grade). Es sind jeweils die Ergebnisse als Foldchange für die Vergleiche zwischen den verschiedenen WHO Graden der Meningeome gezeigt. Eine negative Foldchange bedeutet eine höhere Expression der miRNA in der zweiten Gruppe, eine positive Foldchange, dass die miRNA in der zweiten Gruppe niedriger exprimiert ist. Signifikante Ergebnisse (t-Test, $P < 0,05$) sind fett gedruckt.

	WHO I vs WHO II		WHO I vs WHO III		WHO II vs WHO III	
	Array Set 1	qPCR Set 1	Array Set 1	qPCR Set 1	Array Set 1	qPCR Set 1
miR-222	-1,048	1,006	1,324	1,325	-1,455	1,317
miR-34a-3p	1,417	1,697	1,821	4,116	1,102	2,426
miR-136	1,394	5,083	1,997	11,907	1,568	2,343
miR-376c	2,914	4,100	4,109	12,082	2,221	2,947
miR-195	8,448	1,978	8,862	4,088	1,087	2,067
miR-497	3,073	1,847	5,840	5,241	1,757	2,838
miR-21	-1,034	1,184	-2,923	-1,329	-2,581	-1,574
miR-199a-3p	4,185	1,582	1,058	3,867	-3,621	2,444
miR-218	1,120	1,665	4,779	7,756	3,370	4,657
miR-181a	-2,121	-1,055	-3,574	-1,162	-1,516	-1,101
miR-101	3,014	2,656	3,305	3,678	-1,210	1,385
miR-377	4,214	4,841	2,302	6,316	-1,254	1,305

Im Vergleich zwischen WHO Grad III und WHO Grad I zeigen in der RT-qPCR neun der zwölf untersuchten miRNAs eine mehr als 2-fach niedrigere Expression in den höhergradigen Tumoren. Auch wenn die Foldchange-Werte teilweise eine um das 4- bis 6-fache veränderte Expression anzeigen, ist das Ergebnis, aufgrund großer inter-individueller Unterschiede der Proben innerhalb eines Tumorgades, aber nur für sieben dieser neun miRNAs (miR-195, -101, -218, -497, -376c, -136 und -34a-3p) signifikant. Eine deutliche um das 12-fache niedrigere Expression zeigen miR-136 und -376c. Weiterhin sind miR-34a-3p und -218 in WHO Grad III signifikant niedriger exprimiert als in WHO Grad II und miR-101 ist in WHO Grad II signifikant niedriger exprimiert als in WHO Grad I.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es zum einen miRNAs gibt, die in den Vergleichen zwischen den histologischen Subtypen der WHO Grad I Meningeome differentielle Expression zeigen. Hierzu gehören miR-222, -195 sowie -497. Zum anderen gibt es miRNAs, die im Vergleich zwischen den verschiedenen WHO Graden differentiell exprimiert sind. Hierzu gehören miR-34a-3p, -136, -376c, -195 und -497.

4.2.2 Validierung der RT-qPCR Ergebnisse des ersten Patientenkollektivs in einem unabhängigen Patientenkollektiv

In einem zweiten Schritt sollten die Ergebnisse der RT-qPCR des ersten Patientenkollektivs (Set 1) mit 55 Proben, in einem zweiten unabhängigen Patientenkollektiv mit 95 Proben, bestätigt werden. Diese Proben wurden konsekutiv von allen Patienten, bei denen zwischen Januar 2012 und Oktober 2013 ein Meningeom operativ entfernt wurde, gesammelt. Die Verteilung der WHO Grade und histologischen Subtypen der Tumoren (siehe Tabelle 7 Kapitel 3.1.10) entspricht aus diesem Grund der normalerweise in der Klinik beobachteten Verteilung. Dieses Patientenkollektiv wird im nachfolgenden als Set 2 bezeichnet. Die RT-qPCR wurde, wie zuvor in Kapitel 4.1.2 beschrieben, durchgeführt. Von den zwölf miRNAs, für welche die Microarray-Ergebnisse validiert wurden, wurden hierfür sechs miRNAs ausgewählt (miR-222, -34a-3p, -136, -376c, -195 und -497). Diese zeigten eine signifikante differentielle Expression, entweder zwischen den histologischen Subtypen der WHO Grad I Meningeome oder zwischen den WHO Graden selbst. Die Ergebnisse der Validierung sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefasst. Alle ΔC_q Rohwerte, die zur Berechnung der Foldchange verwendet wurden, finden sich im Anhang in Tabelle A4.

Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der Validierung in einem unabhängigen Patientenkollektiv (Set 2) im Vergleich mit dem ersten Patientenkollektiv (Set 1). Verglichen wurden die Ergebnisse der RT-qPCR zur differentiellen Expression von miRNAs zwischen den histologischen Subtypen der WHO Grad I Meningeome.

Tabelle 14: Validierung der RT-qPCR Ergebnisse in einem unabhängigen Patientenkollektiv (Histologische Subtypen). Es sind jeweils die Ergebnisse für beide Patientenkollektive als Foldchange für die Vergleiche zwischen den histologischen Subtypen der WHO Grad I Meningeome gezeigt. Eine negative Foldchange bedeutet eine höhere Expression der miRNA in der zweiten Gruppe, eine positive Foldchange, dass die miRNA in der zweiten Gruppe niedriger exprimiert ist. Signifikante Ergebnisse (t-Test, $P < 0,05$) sind fett gedruckt.

	Meningothelial vs Fibroblastisch		Meningothelial vs Transitional		Fibroblastisch vs Transitional	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
miR-222	-5,258	-1,042	-4,130	-1,297	1,273	-1,245
miR-34a-3p	-2,024	-1,804	-2,034	-1,521	-1,005	1,186
miR-136	-1,610	-2,205	-1,486	-1,588	1,083	1,388
miR-376c	-2,100	-2,461	-2,242	-2,208	-1,068	1,115
miR-195	-3,312	-1,285	-2,519	1,115	1,315	1,433
miR-497	-3,723	-4,308	-3,901	-1,309	-1,048	3,292

Für miR-497 hat sich die signifikant niedrigere Expression in meningoethelialen Meningeomen im Vergleich zu fibroblastischen Meningeomen in Set 2 bestätigt. Gleiches gilt für miR-376c im Vergleich zwischen meningoethelialen und transitionalen Meningeomen. Während miR-222 und -34a-3p in Set 1 in den meningoethelialen Meningeomen in den jeweiligen Vergleichen signifikant niedriger exprimiert waren, hat sich dieses Ergebnis in Set 2 nur in der Tendenz bestätigt. Dieses Ergebnis muss allerdings vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass in Set 1 gezielt etwa gleiche Gruppengrößen für jeden betrachteten histologischen Subtyp gewählt wurden, während in Set 2 die meningoethelialen Meningeome, im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen, dem allgemeinen klinischen Bild entsprechend, stark überrepräsentiert waren. Aus diesem Grund dominieren die Werte für diese Gruppe, und es werden keine signifikanten Ergebnisse in den Vergleichen mehr erzielt. Die allgemeine Tendenz, dass die meisten miRNAs in den meningoethelialen Meningeomen jeweils niedriger exprimiert sind, bleibt jedoch weitestgehend bestehen.

Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der Validierung mittels RT-qPCR im Vergleich der verschiedenen WHO Grade beider Patientenkollektive.

Tabelle 15: Validierung der RT-qPCR Ergebnisse in einem unabhängigen Patientenkollektiv (WHO Grade). Es sind jeweils die Ergebnisse für beide Patientenkollektive als Foldchange für die Vergleiche zwischen den verschiedenen WHO Graden der Meningeome gezeigt. Eine negative Foldchange bedeutet eine höhere Expression der miRNA in der zweiten Gruppe, eine positive Foldchange, dass die miRNA in der zweiten Gruppe niedriger exprimiert ist. Signifikante Ergebnisse (t-Test, $P < 0,05$) sind fett gedruckt.

	WHO I vs WHO II		WHO I vs WHO III		WHO II vs WHO III	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
miR-222	1,006	1,353	1,325	-1,422	1,317	-1,924
miR-34a-3p	1,697	2,065	4,116	2,441	2,426	1,182
miR-136	5,083	3,904	11,907	9,992	2,343	2,559
miR-376c	4,100	4,316	12,082	13,272	2,947	3,075
miR-195	1,978	1,524	4,088	2,283	2,067	1,498
miR-497	1,847	2,112	5,241	2,056	2,838	-1,027

Die signifikant niedrigere Expression in WHO Grad III im Vergleich zu WHO Grad I hat sich für miR-34a-3p, -376c, -195 und -497 in Set 2 bestätigt. Im Vergleich zwischen WHO Grad II und WHO Grad I sind miR-34a-3p, -136, -376c und -497 signifikant niedriger exprimiert. Im Vergleich zwischen WHO Grad II und III war in Set 2 keine miRNA signifikant differentiell exprimiert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ergebnisse der RT-qPCR für die meisten miRNAs in dem unabhängigen Patientenkollektiv (Set 2) validiert werden konnten. Hierzu gehören miR-34a-3p, -136, -376c und -497 für den Vergleich zwischen WHO Grad I und II,

sowie miR-34-3p, -376c, -195 und -497 für den Vergleich zwischen WHO Grad I und III. Nicht bestätigt werden konnten u.a. die signifikanten Expressionsunterschiede der miR-222 für den Vergleich zwischen dem meningoethelialen und dem fibroblastischen bzw. transitionalen Subtyp der WHO Grad I Meningeome im ersten Patientenkollektiv.

4.3 Identifizierung und Validierung von Zielgenen der miR-34a-3p in Meningeomen

4.3.1 Suche nach potentiellen Zielgenen für miR-34a-3p *in silico*

Die Ergebnisse im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass miR-34a-3p in höhergradigen Meningeomen niedriger exprimiert ist als in Meningeomen mit WHO Grad I. Um die biologischen Auswirkungen dieser Deregulation auf Prozesse in der Zelle durch Veränderung der posttranskriptionellen Regulation potentieller Zielgene zu untersuchen, wurden zunächst mittels frei verfügbarer Datenbanken potentielle Zielgene der miR-34a-3p identifiziert. Zur Suche nach vorhergesagten Zielgenen für miR-34a-3p wurde eine „TargetScan Custom“ Suche mit der Seed-Sequenz der miR-34a-3p durchgeführt. Die Seed-Sequenz einer miRNA ist die Sequenz der Nukleotide 2 bis 8 der reifen miRNA (siehe Abbildung 10).

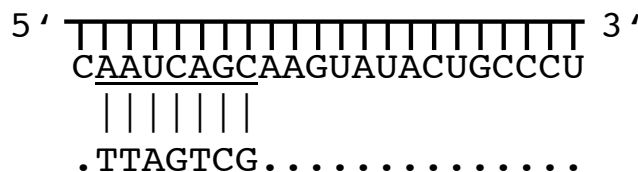


Abbildung 10: Schematische Darstellung der miR-34a-3p. Unterstrichen sind die Nukleotide 2 bis 8, die die Seed-Sequenz von miR-34a-3p darstellen mit der komplementären Sequenz in der 3'UTR der mRNA eines potentiellen Zielgens.

Zunächst wurde in der 3' untranslated region (UTR) aller humanen Sequenzen nach komplementären Sequenzen zur Seed-Sequenz der miR-34a-3p gesucht. Diese sind potentielle Zielgene der miR-34a-3p und unterliegen möglicherweise einer posttranskriptionellen Regulation durch diese miRNA. Anschließend wurde der Fokus auf miRNA-Zielgene gelegt, die eine Rolle in Signalwegen spielen, die als dereguliert in Meningeomen bekannt sind. Basierend auf dieser „TargetScan Custom“ Suche und einer „TargetScan“ Suche für miR-34a-3p, sowie der Überprüfung der mRNA Sequenzen für potentielle Bindestellen für miR-34a-3p, wurden die vorhergesagten Zielgene *FOS*, *SMAD4*, *FRAT1*, *FGF9*, *SRC* und *BCL2* für die weiteren Experimente ausgewählt.

Das *FOS* (Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit)-Gen kodiert für ein Leucin-Zipper Protein, das nach Dimerisierung mit weiteren Proteinen der JUN-Familie den AP-1 Transkriptionskomplex bildet. *FOS* ist an der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt [144].

Das *SMAD4* (SMAD family member 4)-Gen kodiert für ein Protein, das eine wichtige Rolle in der Signalkaskade des TGF- β -Signalweges spielt. Nach Aktivierung durch Phosphorylierung, Dimerisierung mit anderen Proteinen der SMAD-Familie und Translokation in den Zellkern wird die Transkription von Zielgenen aktiviert. Der TGF- β -Signalweg hat u.a. Einfluss auf die Regulation der Proliferation und die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von Zellen [52].

FRAT1 (Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1) gehört zur Familie der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK-3 β)-Bindeproteine. Es verhindert die GSK-3 β -abhängige Phosphorylierung und Degradation von β -Catenin und wirkt somit als Aktivator des Wnt-Signalweges [145].

FGF9 (fibroblast growth factor 9) gehört zur Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren (Fibroblast growth factors, FGF) und wurde ursprünglich als sezernierter Wachstumsfaktor in Gliazell-Kulturen entdeckt. Die FGF-Proteine sind an verschiedenen Signalwegen der Zellentwicklung beteiligt, die eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferation, Überleben und Migration von Zellen spielen. In Tumorzellen wirken sie aus dem Grund als Onkogene [146].

Das *SRC* (SRC proto-oncogene, non receptor thyrosine kinase)-Gen war das erste im Genom von Vertebraten identifizierte Proto-Onkogen. Es besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit mit dem v-src Gen des Rous-Sarkoma Virus, dem ersten entdeckten retroviralen Proto-Onkogen. Die verstärkte Expression von *SRC* führt zu erhöhter Zellmotilität, gesteigerter Proliferation und vermehrtem Überleben von Zellen [147].

BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) ist ein integrales Membranprotein der äußeren Mitochondrien-Membran und ein wichtiger Inhibitor der Apoptose [148]. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass *BCL2* außerdem eine wichtige Rolle bei der Invasion von Tumorzellen in umgebende Gewebe und der Metastasierung von Tumoren spielt [149].

4.3.2 Kontrolle der ektopischen Überexpression der miR-34a-3p nach Transfektion von HEK293T Zellen

Zur Untersuchung regulatorischer Effekte in der 3'UTR vorhergesagter Zielgene für miR-34a-3p wurden Luciferase-Assays mit einem pSG5-miR-34a Expressionsvektor durchgeführt. Bei Verwendung dieses Expressionsvektors wird die reife miRNA, wie andere vom Genom transkribierte miRNAs, durch die zelluläre Prozessierung hergestellt und nicht

als synthetisches Oligonukleotid zugegeben. Da vom pSG5-miR-34a Expressionsvektor in den Zellen beide aktiven Stränge der miR-34a, miR-34a-5p und miR-34a-3p prozessiert werden, wurden sämtliche Reportervektor-Konstrukte so hergestellt, dass die klonierten Bereiche keine Bindestellen für miR-34a-5p besitzen. Zur Herstellung des pSG5-miR-34a Expressionsvektors wurde die miRNA-Vorläufersequenz für miR-34a, mit zusätzlich 40 Basenpaaren up- und downstream dieser Sequenz, *de novo* synthetisiert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BglII* in den pSG5-Vektor ligiert (siehe Kapitel 3.1.5). Die ektoische Überexpression der miR-34a-3p nach transienter Transfektion von HEK293T Zellen mit dem pSG5-miR-34a Expressionsvektor wurde mittels RT-qPCR überprüft. Hierzu wurden HEK293T Zellen mit dem pSG5 Leervektor oder dem pSG5-miR-34a Expressionsvektor transfiziert, 48 Stunden nach der Transfektion die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Das Level der miR-34a-3p in der cDNA wurde mittels eines spezifischen Primers in der RT-qPCR detektiert, als endogene Kontrolle wurde die RNU6B verwendet. Jeweils aus den Mittelwerten von Triplikaten für die Cq Werte für miR-34a-3p und die RNU6B wurde der ΔCq Wert berechnet. Das Ergebnis der RT-qPCR ist in Abbildung 11 zu sehen.

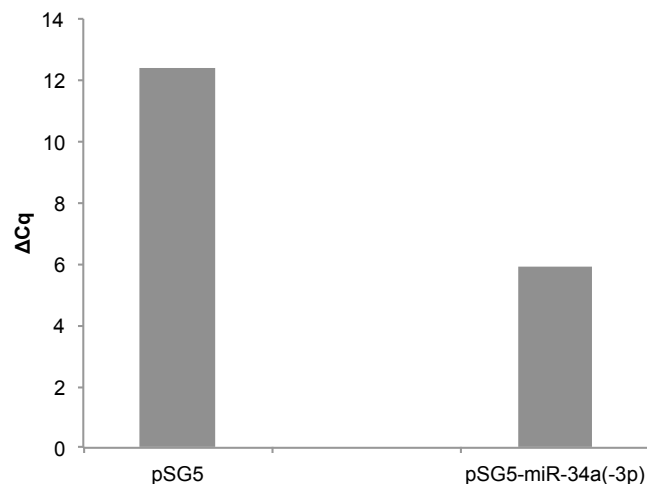


Abbildung 11: RT-qPCR zum Nachweis der ektoischen Überexpression der miR-34a-3p. HEK293T Zellen wurden mit dem pSG5 Leervektor oder dem pSG5-miR-34a Expressionsvektor transfiziert und die Menge an miR-34a-3p in der isolierten Gesamt-RNA mittels RT-qPCR detektiert. Als Referenz wurde die RNU6B verwendet. ΔCq : Differenz zwischen miR-34a-3p und RNU6B.

In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass der ΔCq für miR-34a-3p nach ektoischer Überexpression mit dem pSG5-miR-34a Expressionsvektor nur noch etwa die Hälfte des ΔCq Wertes nach Transfektion mit dem pSG5 Leervektor betrug. Dies entspricht einer um das 88-fache höheren Expression der miR-34a-3p mit Hilfe des pSG5-miR-34a Expressionsvektors nach transienter Transfektion von HEK293T Zellen.

4.3.3 Posttranskriptionelle Regulation von Zielgenen durch miR-34a-3p

Die Validierung ausgewählter Zielgene für miR-34a-3p erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde mittels eines Dual-Luciferase-Assays der erwartete regulatorische Effekt der miRNA an vorhergesagten Bindestellen in der 3'UTR der mRNA des Zielgens untersucht. Der dazu verwendete Reportervektor pMIR-RNL-TK trägt das Gen für die Renilla-Luciferase sowie für die Firefly-Luciferase. Beide Luciferasen werden durch konstitutive Promotoren exprimiert. Der 3'UTR Bereich des zu untersuchenden Zielgens wird hinter das Firefly-Luciferase-Gen des Reportervektors kloniert. Befindet sich in der 3'UTR eine funktionelle miRNA-Bindestelle, kommt es nach Kotransfektion mit der miRNA zur Translationshemmung der Firefly-Luciferase-mRNA, und es kann eine Reduktion der Firefly-Luciferase Aktivität relativ zur Renilla-Luciferase Aktivität festgestellt werden.

Der pSG5-miR-34a Expressionsvektor wurde mit dem pMIR-RNL-TK Konstrukt, welches die jeweilige 3'UTR mit den potentiellen Bindestellen für miR-34a-3p für das jeweilige Zielgen enthält, in HEK293T Zellen kotransfiziert. Als Referenz diente eine Kotransfektion mit dem leeren pSG5 Expressionsvektor und dem entsprechenden pMIR-RNL-TK Konstrukt, als Kontrollen eine Kotransfektion der pSG5 Vektoren mit dem leeren pMIR-RNL-TK Reportervektor. Für den Dual-Luciferase-Assay wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Aktivität beider Luciferasen mit Hilfe eines Luminometers detektiert. Zum Nachweis, dass die Effekte spezifisch durch Bindung der miR-34a-3p an den vorhergesagten Bindestellen in der 3'UTR hervorgerufen werden, wurden die potentiellen Bindestellen, jeweils durch zielgerichtete Mutagenese, durch Schnittstellen für Restriktionsenzyme ersetzt. Dadurch sind diese nicht mehr komplementär zur Seed-Sequenz der miR-34a-3p und der inhibitorische Effekt auf die Translation der Firefly-Luciferase-mRNA geht verloren. Das Verhältnis der Luciferase-Aktivitäten sollte somit dem der jeweiligen Kontrollen entsprechen.

Alle nachfolgend dargestellten Ergebnisse der Luciferase-Assays zeigen die Mittelwerte der Luciferase-Aktivität in relativen Luciferase-Einheiten (RLU: Relative Luciferase Units) mit Standardfehlern (standard error of the mean, SEM) aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. Berechnet wurde zunächst das Verhältnis der Aktivität der Firefly-Luciferase zur Aktivität der Renilla-Luciferase. Die Luciferase-Aktivität, der mit dem leeren pSG5 Expressionsvektor transfizierten Ansätze, wurde jeweils auf 100 % gesetzt und dazu das Verhältnis der Luciferase-Aktivität der Ansätze berechnet, die mit dem pSG5-miR-34a Expressionsvektor transfiziert wurden. Mit einem t-Test wurde überprüft, ob die Luciferase-Aktivität signifikant reduziert war.

Luciferase-Assay für *SMAD4*

Eine schematische Darstellung des Reportervektor-Konstrukts mit der potentiellen Bindestelle für miR-34a-3p in der 3'UTR von *SMAD4*, sowie der durch Mutagenese veränderten Bindestelle, ist in Abbildung 12A gezeigt. In Abbildung 12B ist das Ergebnis der Luciferase-Assays dargestellt.

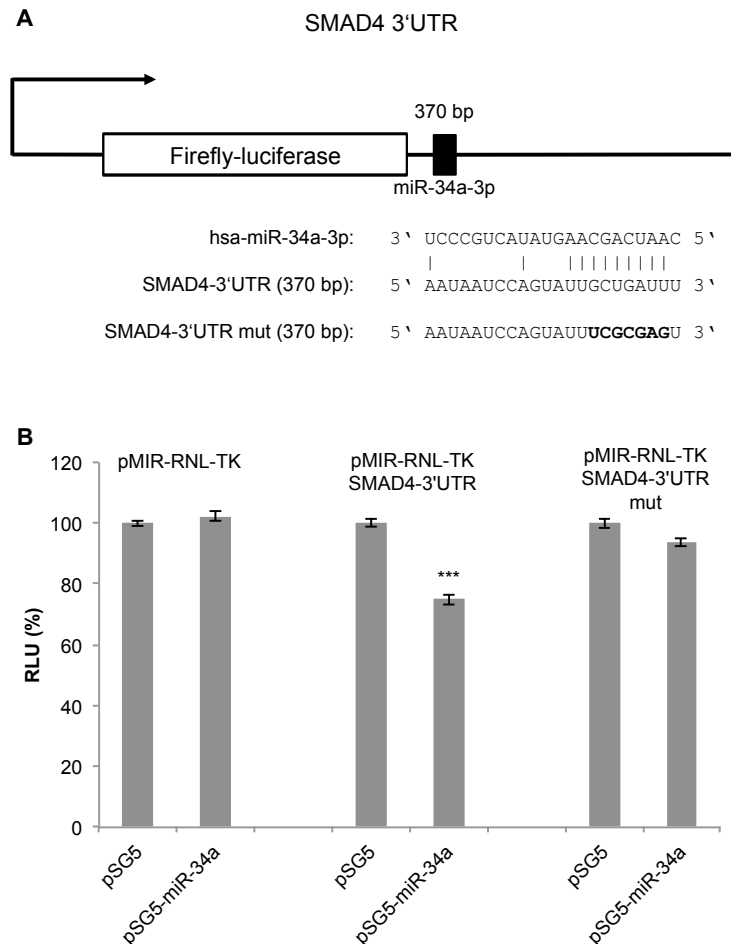


Abbildung 12: Regulatorische Effekte in der 3'UTR von *SMAD4* durch miR-34a-3p. (A) Schematische Darstellung des Reportervektor-Konstrukts für *SMAD4* mit der miRNA Bindestelle (SMAD4-3'UTR) sowie der durch Mutagenese veränderten Bindestelle (SMAD4-3'UTR mut, mutierte Nukleotide fett gedruckt). (B) Luciferase-Assay Ergebnisse 48 h nach Transfektion von HEK293T Zellen. Kotransfiziert wurden jeweils 0,2 µg Reportervektor ohne Insert (pMIR-RNL-TK), der *SMAD4* 3'UTR (pMIR-RNL-TK SMAD4-3'UTR) bzw. der mutierten Bindestelle (pMIR-RNL-TK SMAD4-3'UTR mut) mit jeweils 0,8 µg Kontrollvektor (pSG5) oder dem miRNA-Expressionsvektor (pSG5-miR-34a). Relative Luciferase Einheiten (RLU: Relative Luciferase Units) sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden (***, $P < 0,001$).

Die ektopische Expression der miR-34a mit dem leeren Reportervektor führte zu keiner signifikanten Veränderung der Luciferase-Aktivität. Nach Kotransfektion der miR-34a mit der *SMAD4* 3'UTR war die Luciferase-Aktivität auf 75 % (SEM ± 1,76, $P < 0,001$) reduziert. Nach Mutagenese der miR-34a-3p Bindestelle war keine signifikante Reduktion der Luciferase-Aktivität mehr feststellbar.

Luciferase-Assay für *FGF9*

Abbildung 14A zeigt eine schematische Darstellung des Reportervektor-Konstrukts für *FGF9* mit der potentiellen Bindestelle für miR-34a-3p in der 3'UTR sowie der durch Mutagenese veränderten 3'UTR. In Abbildung 14B ist das Ergebnis des Luciferase-Assays dargestellt.

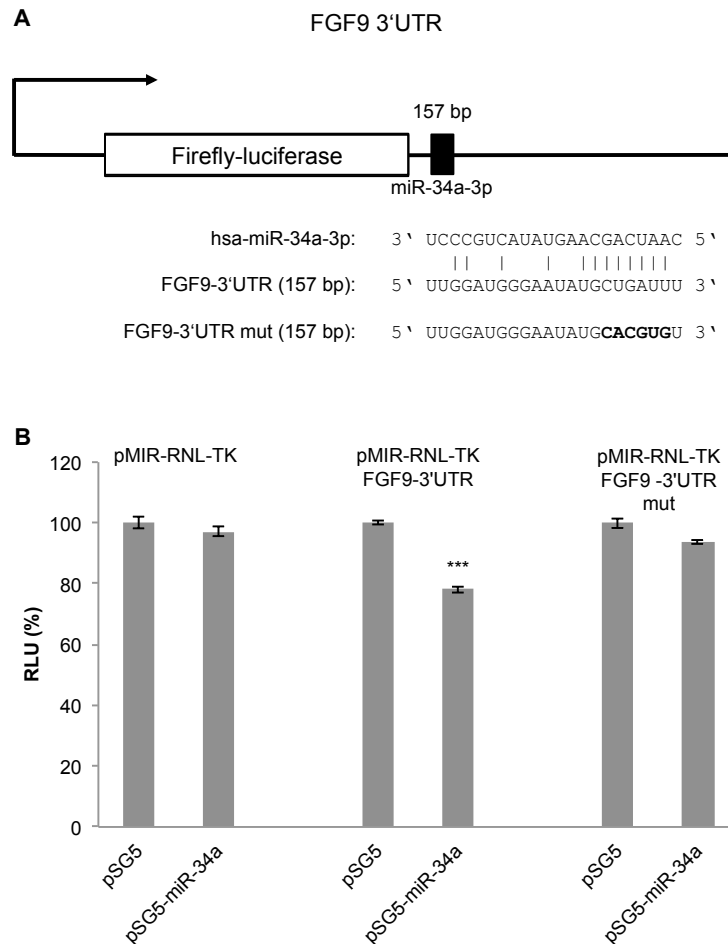


Abbildung 14: Regulatorische Effekte in der 3'UTR von *FGF9* durch miR-34a-3p. (A) Schematische Darstellung des Reportervektor-Konstrukts für *FGF9* mit der miRNA Bindestelle (FGF9-3'UTR) sowie der durch Mutagenese veränderten Bindestelle (FGF9-3'UTR mut, mutierte Nukleotide fett gedruckt). (B) Luciferase-Assay Ergebnisse 48 h nach Transfektion von HEK293T Zellen. Kotransfiziert wurden jeweils 0,2 µg Reportervektor ohne Insert (pMIR-RNL-TK), der *FGF9* 3'UTR (pMIR-RNL-TK FGF9-3'UTR) bzw. der mutierten Bindestelle (pMIR-RNL-TK FGF9-3'UTR mut) mit jeweils 0,8 µg Kontrollvektor (pSG5) oder dem miRNA-Expressionsvektor (pSG5-miR-34a). Relative Luciferase Einheiten (RLU: Relative Luciferase Units) sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden (***, $P < 0,001$).

Die ektopische Expression der miR-34a mit dem leeren Reportervektor führte zu keiner signifikanten Veränderung der Luciferase-Aktivität. Nach Kotransfektion der miR-34a mit der *FGF9* 3'UTR war die Luciferase-Aktivität auf 78 % (SEM ± 1,12, $P < 0,001$) reduziert. Nach Mutagenese der miR-34a-3p Bindestelle in der *FGF9* 3'UTR war keine signifikante Reduktion der Luciferase-Aktivität mehr zu beobachten.

Luciferase-Assays für *FOS* und *SRC*

In Abbildung 15A und 15B sind die Reportervektor-Konstrukte für *FOS* und *SRC* schematisch dargestellt. *FOS* besitzt zwei potentielle Bindestellen für miR-34a-3p in der 3'UTR, *SRC* hingegen nur eine. Abbildung 15C zeigt das Ergebnis der Luciferase-Assays.

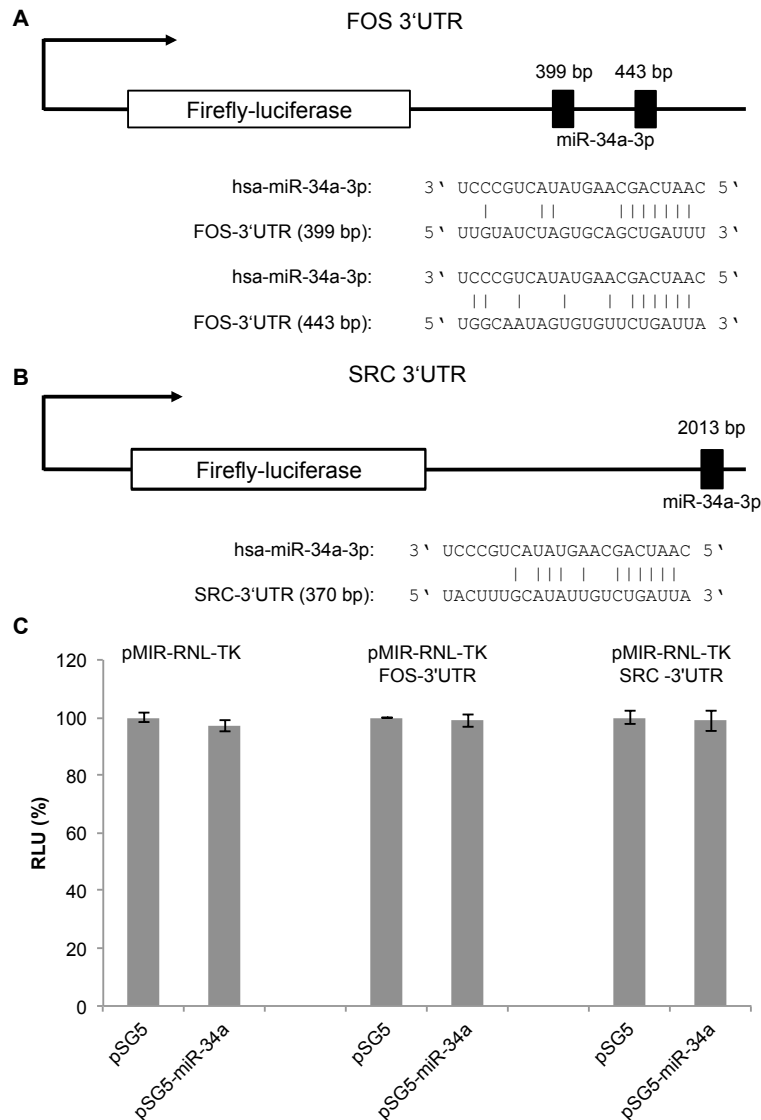


Abbildung 15: Keine regulatorischen Effekte in der *FOS* und *SRC* 3'UTR durch miR-34a-3p.

(A) Schematische Darstellung des Reportervektor-Konstrukts für *FOS* mit den miRNA Bindestellen (*FOS*-3'UTR). (B) Schematische Darstellung des Reportervektor-Konstrukts für *SRC* mit der miRNA Bindestelle (*SRC*-3'UTR). (C) Luciferase-Assay Ergebnisse 48 h nach Transfektion von HEK293T Zellen. Kotransfiziert wurden jeweils 0,2 µg Reportervektor ohne Insert (pMIR-RNL-TK), der *FOS* 3'UTR (pMIR-RNL-TK *FOS*-3'UTR) bzw. der *SRC* 3'UTR (pMIR-RNL-TK *SRC*-3'UTR) mit jeweils 0,8 µg Kontrollvektor (pSG5) oder dem miRNA-Expressionsvektor (pSG5-miR-34a). Relative Luciferase Einheiten (RLU: Relative Luciferase Units) sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Die ektopische Expression der miR-34a hat bei dem leeren Reportervektor, aber auch bei der Kotransfektion der miR-34a mit den 3'UTRs der untersuchten Zielgene *FOS* und *SRC*, zu keiner signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität geführt. Eine Mutagenese der potentiellen Bindestellen wurde hier nicht durchgeführt, weil das Ergebnis der Luciferase-Assays gezeigt hat, dass miR-34a-3p auf die 3'UTR von *FOS* und *SRC* keinen negativen regulatorischen Effekt ausübt.

Luciferase-Assay für *BCL2*

Die schematische Darstellung des Reportervektor-Konstrukts für *BCL2* in Abbildung 16A zeigt, dass sich in der gewählten 3'UTR für *BCL2* zwei potentielle Bindestellen für miR-34a-3p befinden, die nur etwa 300 bp voneinander entfernt liegen. Im Luciferase-Assay wurde daher zunächst ein Reportervektor-Konstrukt verwendet, das beide Bindestellen enthält. Zur weiteren Untersuchung, ob es sich bei beiden Bindestellen um funktionelle Bindestellen handelt, wurden zum einen zwei Einzelmутanten hergestellt, die jeweils eine potentiell funktionelle sowie eine mutierte Bindestelle besitzen, sowie eine Doppelmutante, bei der beide Bindestellen mutiert wurden. Abbildung 16B zeigt das Ergebnis der Luciferase-Assays für *BCL2*.

Nach ektopischer Expression der miR-34a mit dem leeren Reportervektor war auch hier keine signifikante Reduktion der Luciferase-Aktivität feststellbar. Nach Kotransfektion der miR-34a mit der 3'UTR von *BCL2* mit beiden potentiellen Bindestellen war die Luciferase-Aktivität auf 78 % (SEM \pm 2,36, $P < 0,001$) reduziert. Die Ergebnisse der Luciferase-Assays mit den Einzelmутanten und der Doppelmutante zeigten weiterhin, dass beide Bindestellen in der *BCL2* 3'UTR funktionell sind. Die Mutagenese jeweils einer der beiden Bindestellen führte zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität auf 85 % (SEM \pm 2,36, $P < 0,01$) bzw. 87 % (SEM \pm 1,67, $P < 0,05$). Nach Mutagenese beider Bindestellen war keine signifikante Reduktion der Luciferase-Aktivität mehr feststellbar.

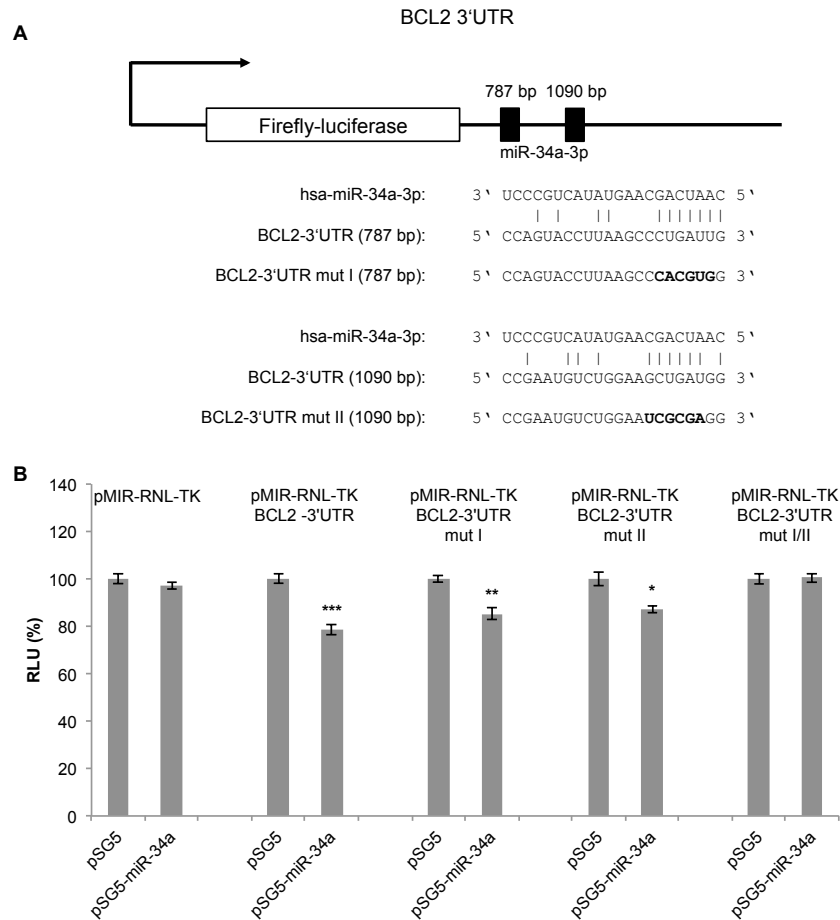


Abbildung 16: Regulatorische Effekte in der 3'UTR von *BCL2* durch miR-34a-3p. (A) Schematische Darstellung des Reportervektor-Konstrukts für *BCL2* mit den miRNA Bindestellen (BCL2-3'UTR) sowie den durch Mutagenese veränderten Bindestellen (BCL2-3'UTR mut I oder mut II, mutierte Nukleotide fett gedruckt). (B) Luciferase-Assay Ergebnisse 48 h nach Transfektion von HEK293T Zellen. Kotransfiziert wurden jeweils 0,2 µg Reportervektor ohne Insert (pMIR-RNL-TK), der *BCL2* 3'UTR (pMIR-RNL-TK BCL2-3'UTR), mit jeweils einer mutierten Bindestelle (pMIR-RNL-TK BCL2-3'UTR mut I oder mut II) bzw. zwei mutierten Bindestellen (pMIR-RNL-TK BCL2-3'UTR mut I/II) mit jeweils 0,8 µg Kontrollvektor (pSG5) oder dem miRNA-Expressionsvektor (pSG5-miR-34a). Relative Luciferase Einheiten (RLU: Relative Luciferase Units) sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Luciferase-Assays ein negativer regulatorischer Effekt der miR-34a-3p auf die 3'UTRs der vorhergesagten Zielgene *SMAD4*, *FRAT1*, *BCL2* und *FGF9* gezeigt werden. Im Gegensatz hierzu konnte dies für die weiteren untersuchten Zielgene, *FOS* und *SRC*, nicht gezeigt werden.

4.3.4 Regulation der endogenen Proteinmenge von Zielgenen der miR-34a-3p in einer Meningeom-Zelllinie

In einem zweiten Validierungsschritt wurde für die miRNA-Zielgene, für die ein negativer regulatorischer Effekt durch miR-34a-3p in den Luciferase-Assays gezeigt werden konnte, die Proteinexpression nach ektoptischer Deregulation der miR-34a-3p in einer Meningeom-Zelllinie untersucht. Hierzu wurde die Zelllinie Ben-Men-1, die aus einem meningoethelialen Meningeom etabliert wurde, verwendet. Die Zellen wurden mit synthetischen Oligonukleotiden für die ektoptische Überexpression (miR-34a-3p (Mimic)) oder Inhibition (anti-miR-34a-3p (Inhibitor)) transfiziert. Zum Ausschluss von unspezifischen Effekten wurden scrambled miRNAs als Negativkontrolle transfiziert. Die Proteinextrakte wurden 48 Stunden nach der Transfektion aus Gesamt-Zelllysat gewonnen. Als endogene Referenz für die Quantifizierung wurde β -Actin verwendet. Das Proteinlysate wurde mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der Nachweis der Proteine wurde mit Hilfe der Immunodetektion, mit spezifischen Antikörpern, im Western-Blot durchgeführt.

Die Western-Blots wurden mit der Image-Lab™ Software quantifiziert. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde zunächst auf die β -Actin Expression normiert. Die relative Erhöhung oder Reduktion der Proteinmenge für die untersuchten Zielgene wurde jeweils durch die Verhältnisse zwischen den mit miR-34a-3p oder anti-miR-34a-3p transfizierten Zellen zur entsprechenden Kontrolltransfektion bestimmt. Die Proteinmenge in der Kontrolltransfektion wurde dabei auf 100 % gesetzt. Ob die endogene Proteinmenge der untersuchten Zielgene signifikant verändert war, wurde mit einem t-Test überprüft.

Immunodetektion von SMAD4 im Western-Blot

Abbildung 17 zeigt das Ergebnis des Western-Blots für SMAD4. Abbildung 17A zeigt einen repräsentativen Western-Blot, während in Abbildung 17B die Quantifizierung der Western-Blots aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt ist. Die Überexpression der miR-34a-3p führte zu einer Reduktion der SMAD4 Proteinmenge auf 76 % (SD \pm 6,6, $P < 0,05$), die Inhibition der miR-34a-3p hingegen führte zu einer Erhöhung der SMAD4 Proteinmenge auf 122 % (SD \pm 2,95, $P < 0,01$), jeweils bezogen auf die Negativkontrolle.

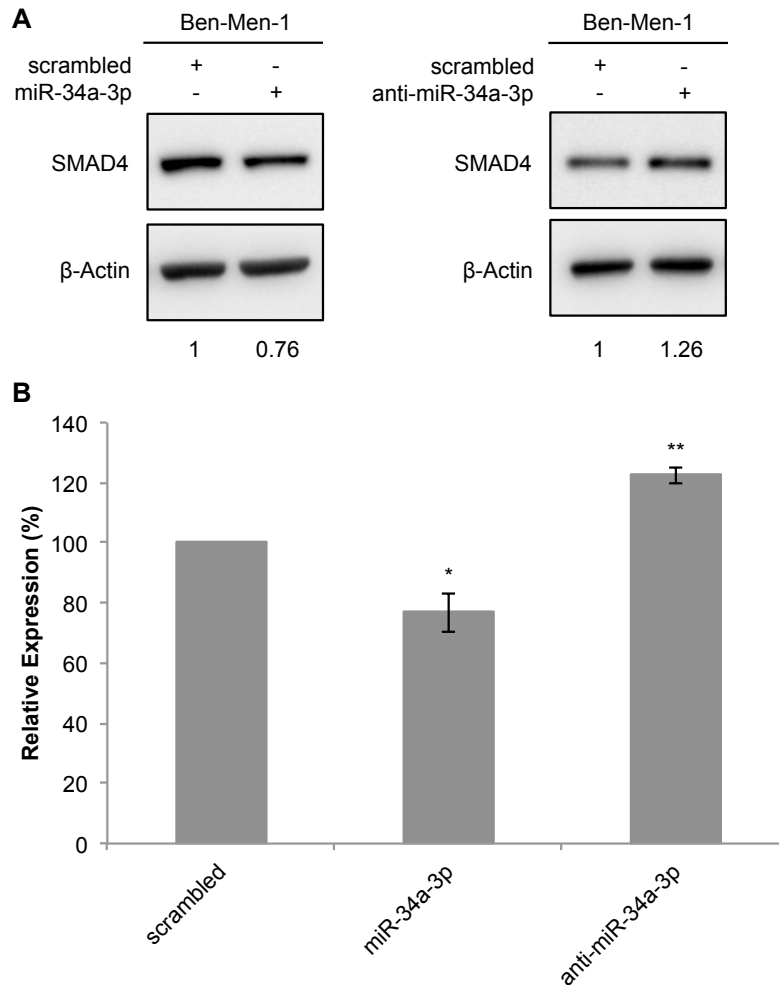


Abbildung 17: Veränderung der SMAD4 Proteinmenge durch Deregulation der miR-34a-3p in Meningeomzellen. (A) Repräsentativer Western-Blot der SMAD4 Proteinexpression 48 h nach Transfektion von Ben-Men-1 Zellen mit der jeweiligen Negativkontrolle (scrambled), dem Mimic für miR-34a-3p (miR-34a-3p) oder dem Inhibitor für miR-34a-3p (anti-miR-34a-3p). Als Ladekontrolle wurde β-Actin verwendet. (B) Quantifizierung der SMAD4 Proteinexpression relativ zu β-Actin in drei unabhängigen Experimenten, dargestellt ist der Mittelwert ± SD (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$)

Immunodetektion von FRAT1 im Western-Blot

Abbildung 18 zeigt das Ergebnis des Western-Blots für FRAT1. Hier ist ebenfalls in Abbildung 18A ein repräsentativer Western-Blot sowie in Abbildung 18B die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Nach Überexpression der miR-34a-3p war die Proteinmenge von FRAT1 auf 68 % (SD ± 4,1, $P < 0,01$) reduziert, während nach Inhibition der miR-34a-3p die Proteinmenge von FRAT1 auf 131 % (SD ± 9,28, $P < 0,05$) erhöht war, jeweils bezogen auf die Negativkontrolle.

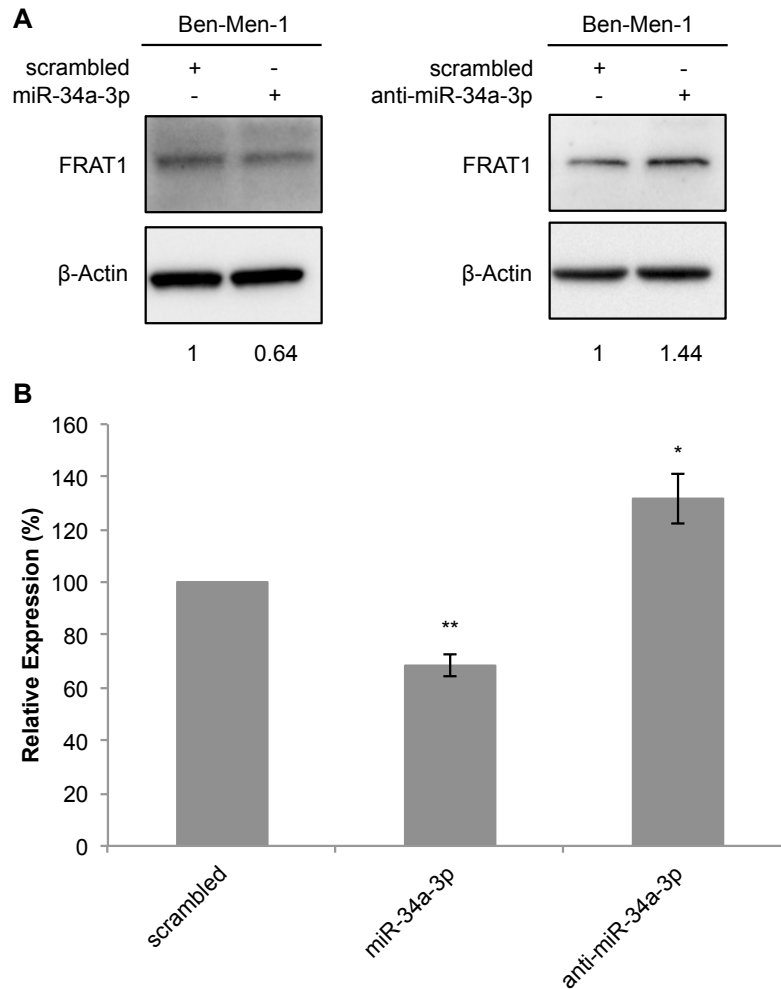


Abbildung 18: Veränderung der FRAT1 Proteinmenge durch Deregulation der miR-34a-3p in Meningeomzellen. (A) Repräsentativer Western-Blot der FRAT1 Proteinexpression 48 h nach Transfektion von Ben-Men-1 Zellen mit der jeweiligen Negativkontrolle (scrambled), dem Mimic für miR-34a-3p (miR-34a-3p) oder dem Inhibitor für miR-34a-3p (anti-miR-34a-3p). Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet. (B) Quantifizierung der FRAT1 Proteinexpression relativ zu β -Actin in drei unabhängigen Experimenten, dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$)

Immunodetektion von BCL2 im Western-Blot

In Abbildung 19 ist das Ergebnis des Western-Blots für BCL2 dargestellt. Abbildung 19A zeigt einen repräsentativen Western-Blot und Abbildung 19B die Quantifizierung der Western-Blots dreier unabhängiger Experimente. Die Überexpression der miR-34a-3p führte zu einer Reduktion der BCL2 Proteinmenge auf 73 % (SD \pm 3,75, $P < 0,01$) und die Inhibition der miR-34a-3p zu einer Erhöhung der BCL2 Proteinmenge auf 116 % (SD \pm 6,32, $P < 0,05$), jeweils in Bezug zur Negativkontrolle.

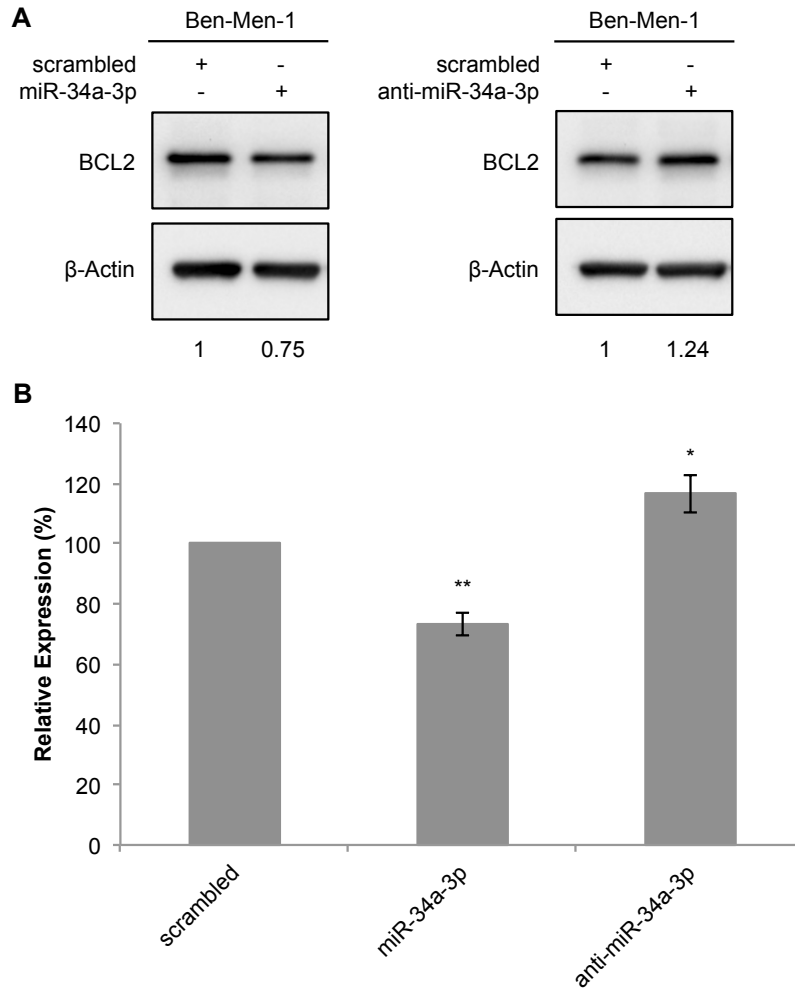


Abbildung 19: Veränderung der BCL2 Proteinmenge durch Deregulation der miR-34a-3p in Meningeomzellen. (A) Repräsentativer Western-Blot der BCL2 Proteinexpression 48 h nach Transfektion von Ben-Men-1 Zellen mit der jeweiligen Negativkontrolle (scrambled), dem Mimic für miR-34a-3p (miR-34a-3p) oder dem Inhibitor für miR-34a-3p (anti-miR-34a-3p). Als Ladekontrolle wurde β-Actin verwendet. (B) Quantifizierung der BCL2 Proteinexpression relativ zu β-Actin in drei unabhängigen Experimenten, dargestellt ist der Mittelwert ± SD (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$)

Zusammengefasst konnte für drei der untersuchten Zielgene, *SMAD4*, *FRAT1* und *BCL2*, eine posttranskriptionelle Regulation durch miR-34a-3p auf Proteinebene bestätigt werden. Für FGF9 konnte die posttranskriptionelle Regulation auf Proteinebene im Western-Blot nicht bestätigt werden. Keiner der kommerziell erworbenen Antikörper lieferte bei der Immunodetektion im Western-Blot spezifische Signale.

4.4 Auswirkungen der Deregulation der miR-34a-3p auf Meningeomzellen *in vitro*

4.4.1 Veränderung der Zellproliferation durch Deregulation der miR-34a-3p

Die vorliegenden Ergebnisse des ersten Teils der Arbeit haben gezeigt, dass in langsam wachsenden WHO Grad I Meningeomen eine insgesamt höhere Expression der miR-34a-3p vorliegt, als in höhergradigen Meningeomen. Im zweiten Teil der Arbeit konnten *SMAD4* und *FRAT1* als direkte Zielgene der miR-34a-3p validiert werden. Diese sind Bestandteil zellulärer Signalwege, die mit der Aktivierung der Proliferation in Verbindung stehen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Auswirkungen der Überexpression oder Inhibition der miR-34a-3p auf die Proliferationsrate von Ben-Men-1 Zellen untersucht.

Hierfür wurden die Zellen mit miR-34a-3p (Mimic) oder anti-miR-34a-3p (Inhibitor) transfiziert und jeweils 72, 96 und 120 Stunden nach der Transfektion gezählt. Als Kontrollen wurden Zellen mit scrambled miRNAs transfiziert oder unbehandelt belassen. Ob die Zellzahl signifikant verändert war, wurde durch einen t-Test ermittelt.

Wie in Abbildung 20A zu sehen, war nach Transfektion mit miR-34a-3p ein signifikanter Rückgang der Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle und den unbehandelten Zellen zu erkennen. Nach Transfektion mit anti-miR-34a-3p gab es keinen signifikanten Unterschied der Proliferationsrate im Vergleich mit den Kontrollen (siehe Abbildung 20B). Beide Abbildungen zeigen jeweils die Proliferationskurve eines Experiments, das in Triplikaten durchgeführt wurde.

Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass eine erhöhte intrazelluläre Menge der miR-34a-3p, und damit eine erniedrigte Proteinmenge von SMAD4 und FRAT1, zu einer Reduktion der Zellproliferation beitragen könnte.

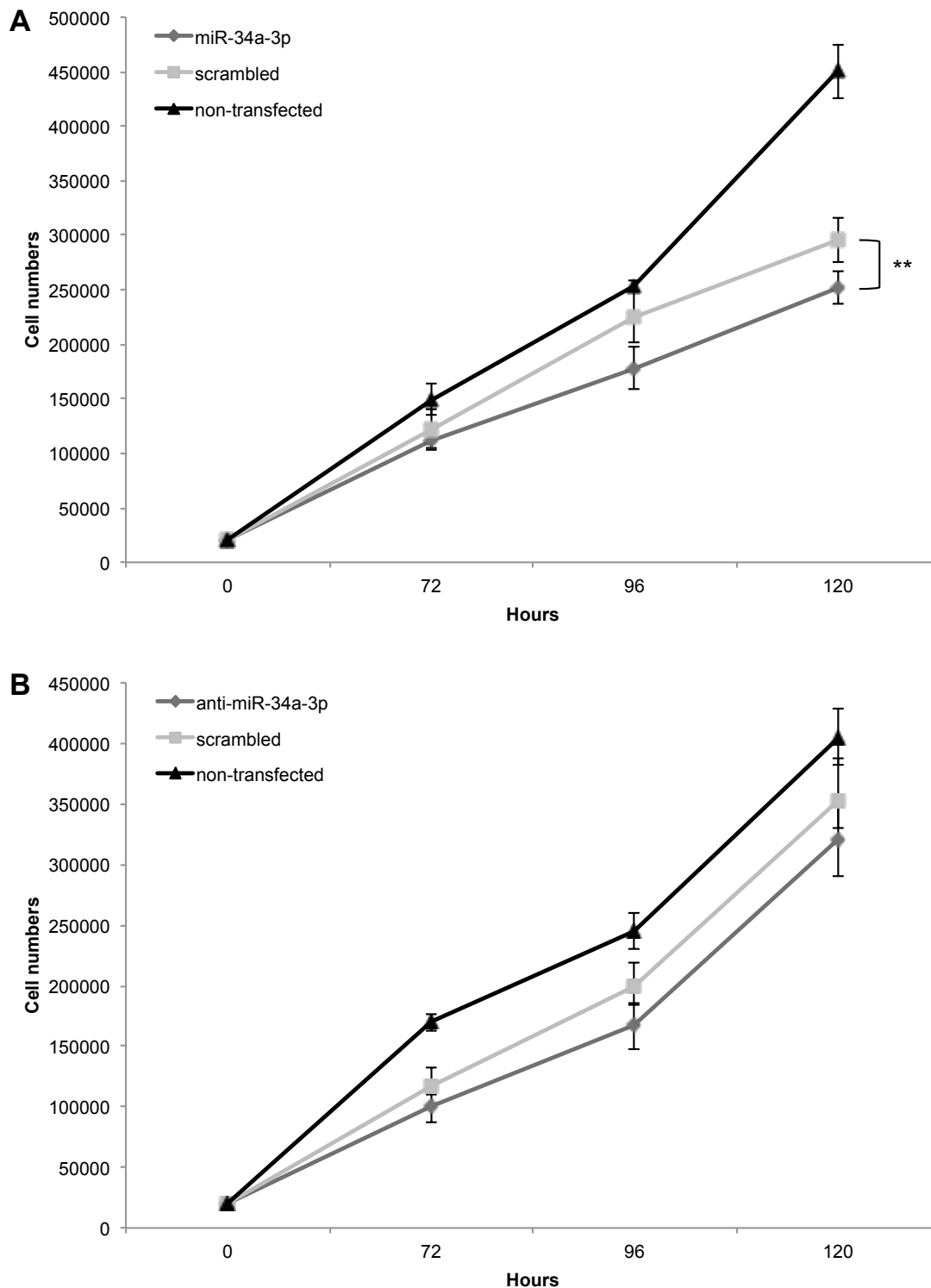


Abbildung 20: Regulation der Proliferation von Meningeomzellen durch miR-34a-3p.

(A) Ergebnisse der Zellzählung nach Transfektion mit miR-34a-3p (Mimic), der Negativkontrolle (scrambled) oder für unbehandelte Zellen (non-transfected). (B) Ergebnisse der Zellzählung nach Transfektion mit anti-miR-34a-3p (Inhibitor), der Negativkontrolle (scrambled) oder für unbehandelte Zellen (non-transfected). Die Zellen wurden jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und gezählt. Die Abbildungen zeigen jeweils die Proliferationskurve eines Experiments, das in Triplikaten durchgeführt wurde. Die Zellzahlen sind Mittelwerte \pm SD (**, $P < 0,01$).

4.4.2 Veränderung der Apoptose durch Deregulation der miR-34a-3p

Im zweiten Teil der Arbeit konnte das anti-apoptotische Protein BCL2 als direktes Zielgen der miR-34a-3p validiert werden. Um die Auswirkungen der Deregulation der miR-34a-3p auf die Apoptose von Meningeomzellen zu untersuchen, wurden Ben-Men-1 Zellen mit miR-34a-3p (Mimic) und anti-miR-34a-3p (Inhibitor) und den entsprechenden Negativkontrollen transfiziert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde direkt nach der Ernte an vitalen Zellen mittels einer FACS-Analyse nach Färbung der Zellen mit Alexa Fluor® 488 Annexin V / Propidiumiodid (PI) 48 und 72 Stunden nach der Transfektion ermittelt.

Abbildung 21 zeigt einen exemplarischen Scatter-Plot einer solchen FACS-Analyse.

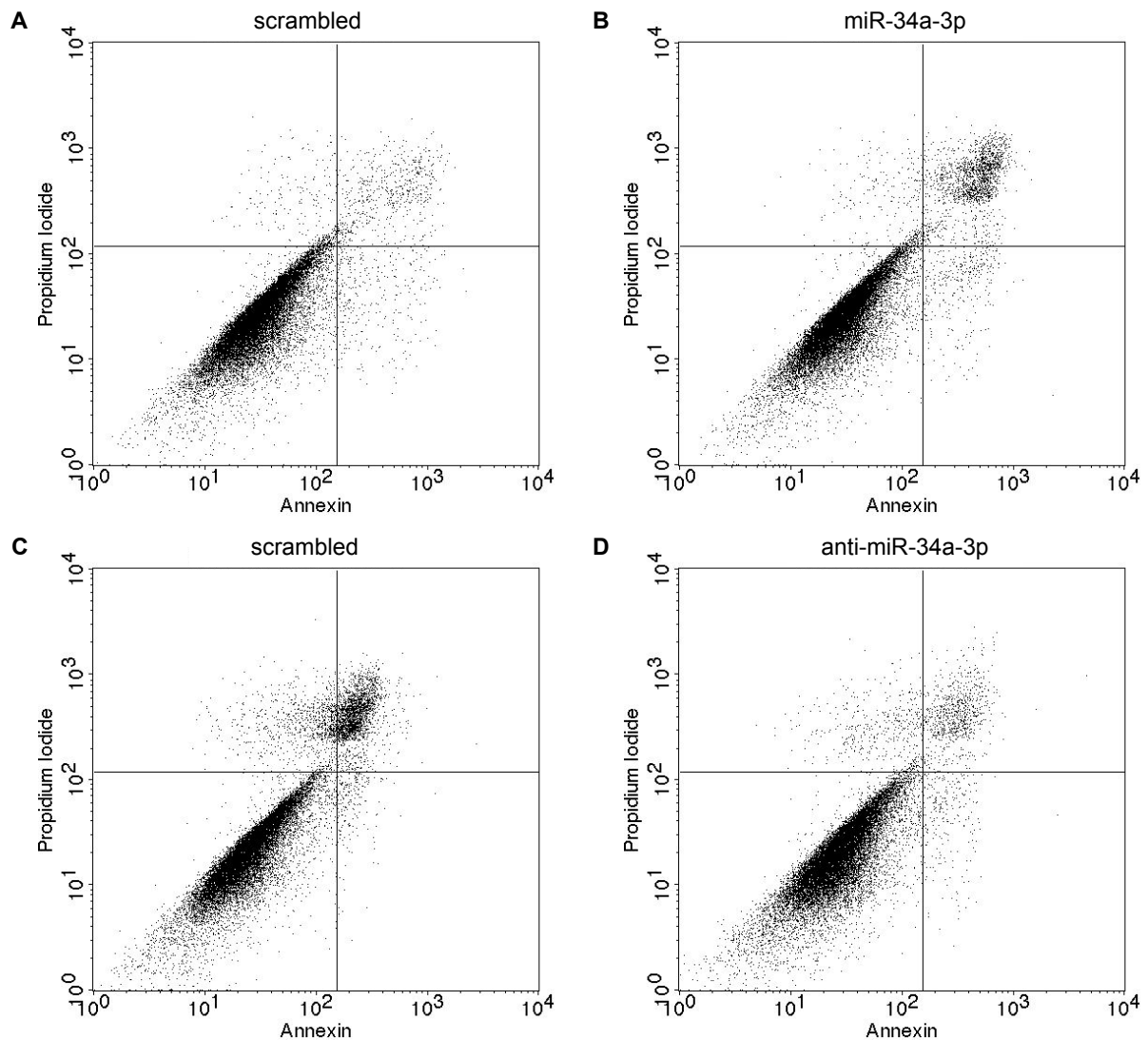


Abbildung 21: Exemplarischer Scatter-Plot der FACS-Analyse zur Detektion apoptotischer Zellen. (A) Negativkontrolle (scrambled) für miR-34a-3p, (B) miR-34a-3p (Mimic), (C) Negativkontrolle (scrambled) für anti-miR-34a-3p und (D) anti-miR-34a-3p (Inhibitor). Alle Scatter-Plots zeigen die Messung nach 72 h. X-Achse: Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor® 488 Annexin V, Y-Achse: Fluoreszenzintensität von Propidiumiodid (PI).

Im unteren linken Quadranten auf dem Scatter-Plot befindet sich die größte Zellpopulation. Dies sind alle vitalen Zellen, bei denen keine Färbung mit Annexin V oder PI nachweisbar ist. Ein Merkmal der frühen Apoptose ist der „Flip“ von Membranlipiden mit dem Baustein Phosphatidylserin in die äußere Schicht der Zellmembran, die normalerweise nur in der inneren Schicht vorkommen. Annexin V bindet an diese Phosphatidylserin-Reste. Zellen, an denen Annexin V bindet, befinden sich in der frühen Apoptose. Diese Zellpopulation befindet sich auf dem Scatter-Plot im unteren rechten Quadranten. Zellen, die nur positiv für PI sind, befinden sich im oberen linken Quadranten, dies sind alle bereits abgestorbenen Zellen. Zellen die positiv für Annexin V und PI sind, sind noch intakt, die Zellmembran ist aber bereits durchlässig für PI. Diese Zellpopulation befindet sich im oberen rechten Quadranten und ist in der späten Apoptose oder Nekrose. Die Größe dieser Zellpopulation ist nach Deregulation der miR-34a-3p verändert.

Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der FACS-Analyse nach Auswertung des oberen rechten Quadranten. Es sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Mit einem t-Test wurde überprüft, ob der Anteil der Zellpopulation signifikant verändert war.

Die Überexpression der miR-34a-3p führte verglichen mit der Negativkontrolle sowohl nach 48 als auch 72 Stunden zu einem erkennbaren, aber nicht signifikant erhöhten Anteil an Zellen, welche sich in der späten Apoptose oder Nekrose befinden (siehe Abbildung 22A). Die Inhibition der miR-34a-3p führte dagegen im Vergleich zur Negativkontrolle sowohl nach 48 als auch 72 Stunden zu einem signifikanten Rückgang des Anteils an Zellen, welche sich in der späten Apoptose oder Nekrose befinden (siehe Abbildung 22B). Weiterhin war ein signifikanter Unterschied im Anteil an Zellen in der späten Apoptose und Nekrose im direkten Vergleich nach Überexpression oder Inhibition der miR-34a-3p 72 Stunden nach der Transfektion (miR-34a-3p 7,3 % vs. anti-miR-34a-3p 3,8 %, $P < 0,05$) festzustellen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass eine erniedrigte intrazelluläre Menge der miR-34a-3p, mit einem Rückgang der Apoptose in Meningeomzellen *in vitro* in Verbindung zu stehen scheint.

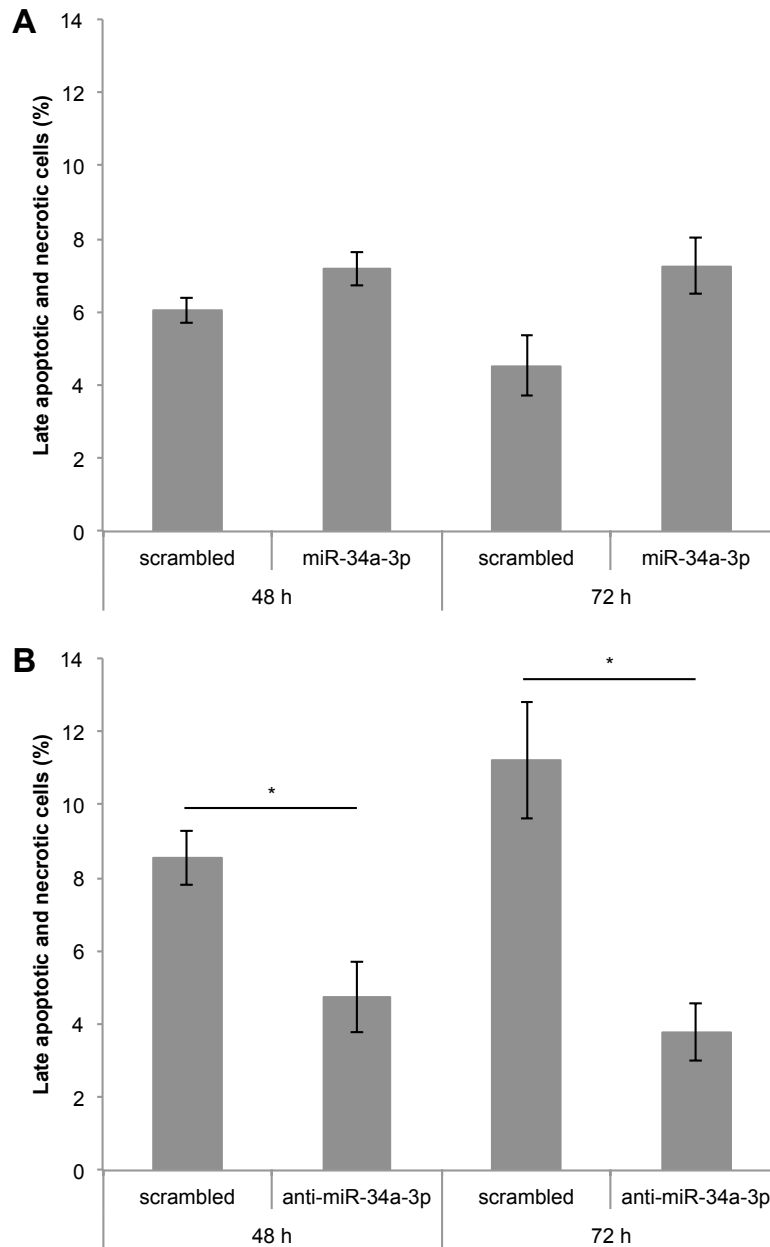


Abbildung 22: Die Deregulation der miR-34a-3p verändert Apoptose und Nekrose von Meningeomzellen *in vitro*. (A) FACS-Analyse von Ben-Men-1 Zellen nach Transfektion mit miR-34a-3p (Mimic) oder der Negativkontrolle (scrambled) (B) FACS-Analyse von Ben-Men-1 Zellen nach Transfektion mit anti-miR-34a-3p (Inhibitor) oder der Negativkontrolle (scrambled). Die Zellen wurden jeweils 48 und 72 Stunden nach der Transfektion geerntet, mit Annexin V / PI gefärbt und im FACS analysiert. Der Anteil an Zellen in der späten Apoptose und Nekrose (Late apoptotic and necrotic cells) sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten (*, $P < 0,05$).

5. Diskussion

Ein erstes Teilziel der vorliegenden Arbeit war die Validierung ausgewählter miRNAs, eines mittels Microarrays erstellten miRNA-Expressionsprofils, in Meningeomen verschiedener WHO Grade und histologischer Subtypen. Durch die Microarray-Analyse konnten insgesamt 57 miRNAs als differentiell exprimiert identifiziert werden, von denen 12 für die Validierung mittels RT-qPCR ausgewählt wurden. Dabei bestätigte sich, dass es sowohl miRNAs gibt, die signifikante differentielle Expression zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen der WHO Grad I Meningeome zeigen, als auch solche, die zwischen den verschiedenen WHO Graden der Meningeome signifikant differentiell exprimiert sind. Die differentielle Expression von sechs dieser miRNAs wurde anschließend in einem unabhängigen Patientenkollektiv mittels RT-qPCR validiert, wobei die Ergebnisse für fünf der ausgewählten miRNAs bestätigt werden konnten.

Zur weiteren Untersuchung der Zusammenhänge zwischen differentieller miRNA-Expression und dem Einfluss auf die Tumorgenese bzw. Progression von Meningeomen wurde für miR-34a-3p, deren Expression mit steigendem WHO Grad abnimmt, nach potentiellen Zielgenen gesucht. Hierbei wurden *SMAD4*, *FRAT1* und *BCL2* als Zielgene der miR-34a-3p experimentell bestätigt. Diese Zielgene konnten in Bezug zu Signalwegen gesetzt werden, die in Meningeomen als dereguliert bekannt sind, hierzu gehören der Wnt/ β -Catenin-, TGF- β - und Apoptose-Signalweg. Außerdem konnten validierte und potentielle Zielgene, weiterer signifikant differentiell exprimierter miRNAs, in Zusammenhang mit diesen Signalwegen oder allgemein, in Zusammenhang mit der Entstehung bzw. Progression von Meningeomen, gebracht werden.

Weiterhin wurden die Auswirkungen der Deregulation der miR-34a-3p auf die Proliferation und Apoptose von Meningeomzellen *in vitro* untersucht. Die Überexpression der miR-34a-3p führte in der Meningeom-Zelllinie Ben-Men-1 zu einer signifikant verringerten Proliferation und einer tendenziell erhöhten Apoptose. Die Inhibition der miR-34a-3p führte zu einem signifikanten Rückgang der Apoptose.

5.1 Validierung differentiell exprimierter miRNAs in Meningeomen

Die Ergebnisse des miRNA-Expressionsprofils mittels Microarrays wurden im ursprünglichen Patientenkollektiv sowie einem unabhängigen Patientenkollektiv mittels RT-qPCR validiert.

Die Ergebnisse der Validierung im ersten Patientenkollektiv zeigten eine niedrigere Expression der miR-222, -34a-3p, -195, -497, -199a-3p und -377 in meningoethelialen Meningeomen im Vergleich zu fibroblastischen Meningeomen. Dies konnte für miR-497 im unabhängigen Patientenkollektiv bestätigt werden. MiR-376c war in beiden Patientenkollektiven in meningoethelialen Meningeomen niedriger exprimiert als in transitionalen Meningeomen.

Eine signifikant niedrigere Expression in Meningeomen mit WHO Grad III im Vergleich zu WHO Grad I konnte für miR-34a-3p, -376c, -195 und -497 im unabhängigen Patientenkollektiv bestätigt werden. Für miR-34a-3p, -376c, -136 und -497 konnte eine signifikant niedrigere Expression von Meningeomen mit WHO Grad II im Vergleich zu WHO Grad I bestätigt werden.

Hierbei ist festzustellen, dass viele dieser differentiell exprimierten miRNAs in chromosomalen Regionen lokalisiert sind, für die bekannt ist, dass sie mit der Entstehung bzw. Progression von Meningeomen assoziiert sind [5, 27]. Tabelle 16 gibt eine Übersicht über die zwölf zur Validierung mittels RT-qPCR ausgewählten miRNAs und ihre chromosomale Lokalisation.

Tabelle 16: Ausgewählte miRNAs für die Validierung der Microarray-Ergebnisse und ihre chromosomale Lokalisation. RTL1: retrotransposon-like 1; DNM2: dynamin 2; SLIT2: slit guidance ligand 2; NR6A1: nuclear receptor subfamily 6 group A member 1

miRNA	Chromosomale Lokalisation
miR-222	Xp11.3, Intergenisch
miR-34a-3p	1p36.22, Intergenisch
miR-136	14q32.2, Exon von <i>RTL1</i>
miR-376c	14q32.31, Intergenisch
miR-195	17p13.1, Intergenisch
miR-497	17p13.1, Intergenisch
miR-21	17q23.1, Intergenisch
miR-199a-3p	19p13.2, Intron von <i>DNM2</i>
miR-218	4p15.31, Intron von <i>SLIT2</i>
miR-181a	9q33.3, Intron von <i>NR6A1</i>
miR-101	1p31.3, Intergenisch
miR-377	14q32.31, Intergenisch

MiR-136, -376c und -377 sind im miR-379/656 Cluster lokalisiert, das innerhalb der DLK1-DIO3 Region auf Chromosom 14q32 liegt. Eine Deletion von Chromosom 14q ist eine

häufige zytogenetische Aberration, vor allem in höhergradigen Meningeomen [27, 29], jedoch wurden auf diesem Chromosom aktuell nur wenige Tumorsuppressor-Gene, die zur Progression in Meningeomen beitragen könnten, identifiziert. Die DLK1-DIO3 Region spielt eine Rolle während der Embryonalentwicklung und der Tumorgenese [73, 74]. Die Expression der Gene in diesem Cluster ist durch genomisches Imprinting gesteuert [74]. Die Gene *DLK1* (delta like non-canonical Notch ligand 1), *RTL1* (retrotransposon-like 1) und *DIO3* (deiodinase, iodothyronine, type III) werden vom paternalen Allel exprimiert, *MEG3* (maternally expressed 3 (non-protein coding)) und *MEG8* (maternally expressed 8 (non-protein coding)) vom maternalen Allel. Die in diesem Cluster kodierten miRNAs werden vom maternalen Allel exprimiert [73, 74]. In Meningeomen kommt es, aufgrund einer Hypermethylierung des *MEG3*-Promotors oder von Deletionen im *MEG3*-Gen, zu einer erniedrigten Expression von *MEG3* [30]. Eine erniedrigte Expression von miRNAs des miR-379/656 Clusters konnte für verschiedene Tumoren gezeigt werden, darunter Tumoren der Niere, Brust und Eierstöcke sowie Glioblastome [150], Tumoren des gastrointestinalen Stromas [151] und Neuroblastome [152]. Die epigenetischen und zytogenetischen Veränderungen auf Chromosom 14q in höhergradigen Meningeomen könnten eine Ursache für eine niedrigere Expression der auf diesem Chromosom kodierten miRNAs sein.

Auf Chromosom 17q, einer Region, die in höhergradigen Meningeomen oft Amplifikationen aufweist [12], ist die bekannte onko-miRNA miR-21, die in zahlreichen Tumoren überexprimiert ist [107], lokalisiert. Eine signifikante Überexpression der miR-21 in höhergradigen Tumoren, welche initial in den Microarray-Experimenten detektiert wurde, konnte in der RT-qPCR nicht bestätigt werden. Es lag lediglich eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der miR-21 Expression in höhergradigen Meningeomen vor. Eine aktuelle Studie bestätigt allerdings eine Überexpression der miR-21 in atypischen und anaplastischen Meningeomen [128]. Amplifikationen auf Chromosom 17q könnten mit zu dieser Überexpression beitragen.

Deletionen von Chromosom 1p treten bei über 70 % aller WHO Grad III Meningeome auf und stehen in engem Zusammenhang mit der Progression der Tumoren [27, 28]. Die vorliegenden Ergebnisse haben eine signifikant niedrigere Expression der miR-34a-3p, die auf Chromosom 1p36 kodiert ist, in Meningeomen mit WHO Grad III gezeigt. Deletionen von Teilen oder des gesamten Chromosoms 1p könnten eine Ursache für die erniedrigte miRNA-Expression sein.

5.2 Identifizierung und Validierung von Zielgenen der miR-34a-3p in Meningeomen

Für die miR-34a-5p gibt es zahlreiche Studien, die eine wichtige Rolle dieser Tumorsuppressor-miRNA bei der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung und Apoptose in verschiedenen Tumoren belegen [153-155]. Im Vergleich zur miR-34a-5p sind die posttranskriptionellen regulatorischen Effekte der miR-34a-3p weniger gut untersucht. Es wurde jedoch gezeigt, dass beide miRNA-Stränge, miR-34a-5p und miR-34a-3p, die von der pre-miR-34a prozessiert werden, regulatorische Aktivität auf Zielgene ausüben können [156]. Für miR-34-3p gibt es bisher nur fünf experimentell validierte Zielgene: *XIAP* (X-linked inhibitor of apoptosis) [157], *TNF* (tumor necrosis factor), *SP4* (Sp4 transcription factor), *JUN* (Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit) [156] und *CTNNB1* (β -Catenin) [158]. Durch den Einsatz des Next-Generation Sequencing werden, zwar aufgrund zahlreicher verfügbarer Sequenzen viele Zielgene vorhergesagt, jedoch bestätigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass vorhergesagte Zielgene nicht immer experimentell als Zielgene validiert werden können. Bei drei von sechs untersuchten Zielgenen (*FRAT1*, *SMAD4* und *BCL2*) konnte eine posttranskriptionelle Regulation auf Ebene der mRNA und des Proteins durch miR-34-3p gezeigt werden. Bei einem untersuchten Zielgen (*FGF9*) konnte die Regulation auf Ebene der mRNA durch miR-34a-3p bestätigt werden. Bei zwei weiteren (*FOS* und *SRC*) waren keine regulatorischen Effekte bei den untersuchten potentiellen Bindestellen der miR-34a-3p in der 3'UTR zu beobachten.

5.3 miRNA-Zielgene und ihr Einfluss auf zelluläre Signalwege in Meningeomen

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant niedrigere Expression der miR-34-3p, -376c, -136, -195 und -497 in höhergradigen Meningeomen gezeigt werden. Die in dieser Arbeit validierten Zielgene der miR-34a-3p, *SMAD4*, *FRAT1* und *BCL2*, sowie die bereits in anderen Studien experimentell validierten Zielgene der oben angeführten miRNAs, können mit verschiedenen Signalwegen in Verbindung gebracht werden, die in Meningeomen dereguliert sind. Zwei größere Studien haben die Genexpression in aggressiv wachsenden, benignen Meningeomen sowie die Proteinexpression in höhergradigen Meningeomen untersucht [159, 160]. Einige der in diesen Tumoren überexprimierten Gene oder Proteine sind potentielle Zielgene der deregulierten miRNAs und könnten ebenfalls zelluläre Signalwege beeinflussen.

5.3.1 Der TGF- β Signalweg und SMAD4

Der Transkriptionsfaktor SMAD4 ist eine Schlüsselkomponente des TGF- β Signalweges [52]. Nach Bindung von TGF- β an einen Typ II TGF- β -Rezeptor dimerisiert dieser mit einem Typ I TGF- β -Rezeptor. Nachfolgend werden SMAD2 und SMAD3 phosphoryliert und bilden einen Komplex mit SMAD4. Dieser Proteinkomplex wird in den Zellkern transportiert und steuert dort, gemeinsam mit verschiedenen weiteren Transkriptionsfaktoren, Aktivatoren und Repressoren, die Transkription von Zielgenen des TGF- β Signalweges. Dieser hat in Abhängigkeit vom Stadium der Tumorgenese unterschiedlichen Einfluss auf die Tumorzellen [52]. In frühen Stadien der Tumorentstehung inhibiert er die Proliferation und induziert Apoptose, wirkt also reprimierend auf die Tumorzellen. In späteren Stadien kehrt sich dies jedoch um und die Tumorgenese wird durch den TGF- β Signalweg forciert, indem es zur Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), verstärkter Angiogenese und einer Suppression des Immunsystems kommt [52]. Die antiproliferative Wirkung von TGF- β wird u.a. durch die Regulation der Expression des onkogenen Transkriptionsfaktors c-MYC und von Zellzyklus-Inhibitoren wie CDKN2B/p15^{INK4b} gesteuert [161]. Maligne Zellen verlieren ihre Sensitivität für antiproliferative und pro-apoptotische TGF- β Signale durch Inaktivierung von TGF- β Rezeptoren oder Veränderungen in der SMAD-Signalkaskade [161]. Eine aktive Sekretion von TGF- β durch die Tumorzellen bei fortgeschrittener Tumorgenese verstärkt die Suppression des Immunsystems und die Induktion der EMT [161].

Ein Verlust der Heterozygotie, Deletionen oder Loss-of-Function Mutationen, die das *SMAD4*-Gen betreffen, das auf Chromosom 18q lokalisiert ist, treten bei Darmkrebs, Lungenkrebs und Tumoren der Bauchspeicheldrüse auf, was für eine Funktion als Tumorsuppressor in diesen Tumoren spricht [162-164]. Dies ist hingegen bei Tumoren der Brust und der Prostata nicht der Fall [165, 166]. In höhergradigen Meningeomen kommt es zu Deletionen von Chromosom 18q, es wurden jedoch keine Mutationen oder eine verminderte Expression des *SMAD4*-Lokus beobachtet, die einen Einfluss auf die Pathogenese von Meningeomen haben könnten [167].

Abbildung 23 gibt einen Überblick, welche Auswirkungen die erniedrigte Expression von miRNAs und somit der Verlust der posttranskriptionellen Regulation von *SMAD4* und weiterer Zielgene auf den TGF- β Signalweg haben könnte.

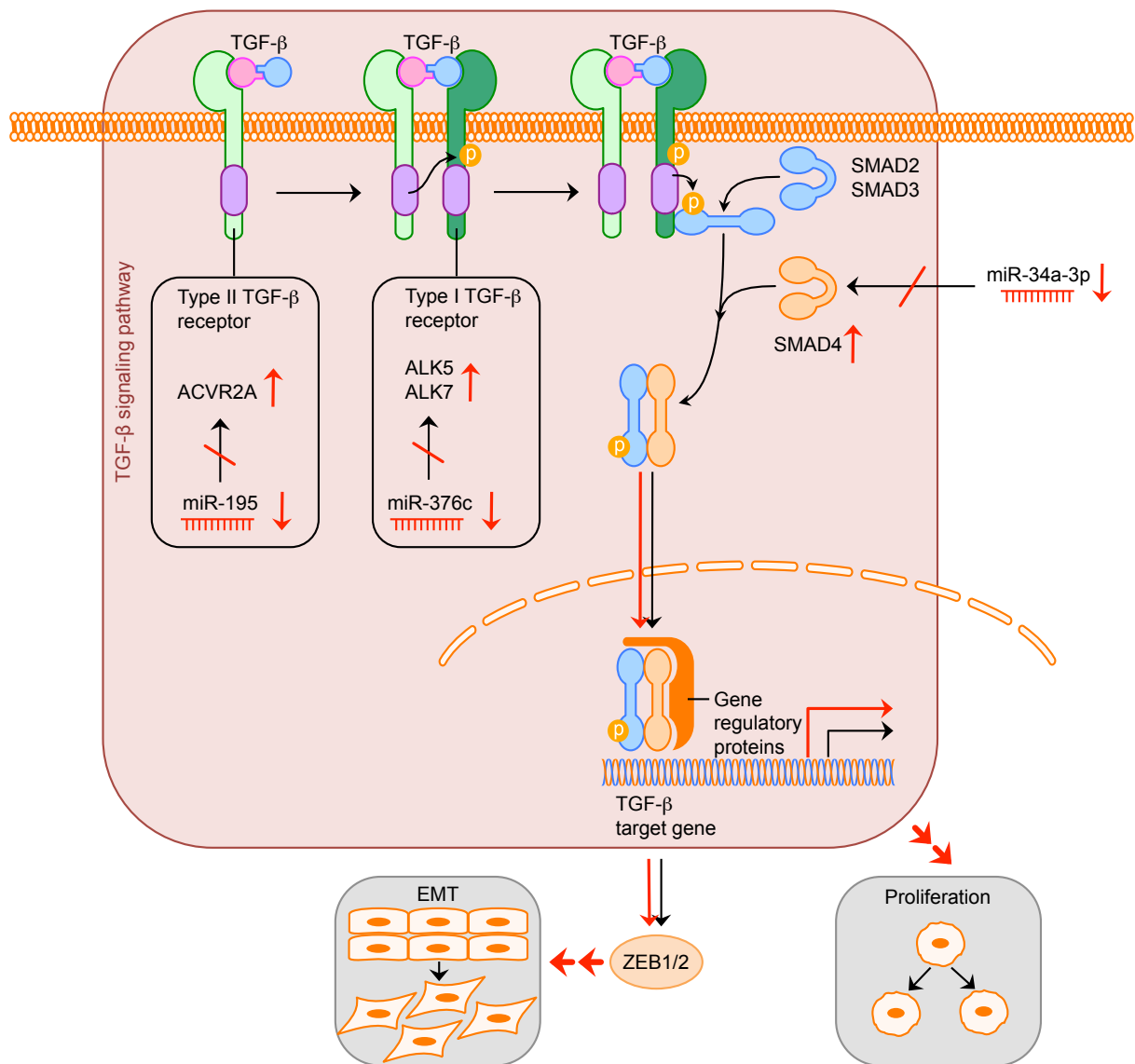


Abbildung 23: Mögliche Auswirkungen deregulierter miRNAs auf den TGF-β Signalweg. Der normale Ablauf des Signalweges nach Aktivierung durch TGF-β am Rezeptor wird durch schwarze Pfeile symbolisiert (spitze Pfeile: Aktivierung). Die möglichen Auswirkungen auf den Signalweg, bedingt durch niedriger exprimierte miRNAs, werden durch rote Pfeile symbolisiert. Eine übermäßige Aktivierung des TGF-β Signalweges führt zu verstärkter epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) und Proliferation. TGF-β: transforming growth factor β; ACVR2A: activin A receptor type 2A; ALK5: transforming growth factor beta receptor 1; ALK7: activin A receptor type 1C; SMAD2/3/4: SMAD family member 2/3/4; ZEB1: zinc finger E-box binding homeobox 1; ZEB2: zinc finger E-box binding homeobox 2

Eine Aktivierung des TGF-β Signalweges kann die sogenannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) induzieren [168, 169]. Dieser Vorgang führt zu einer Veränderung der zellulären Morphologie von epithelial zu mesenchymal, durch verringerte Expression epithelialer Marker (z.B. E-Cadherin und verschiedene Cytokeratine) und Überexpression mesenchymaler Marker (z.B. Vimentin, N-Cadherin und Fibronectin) [168, 169]. Bei Meningeomen ist eine verringerte Expression von E-Cadherin sowie eine Überexpression

von Vimentin in höhergradigen Tumoren bekannt [46, 160]. Die Regulation der Expression epithelialer und mesenchymaler Marker durch den TGF- β Signalweg wird durch verschiedene Zielgene dieses Signalweges gesteuert, u.a. die Transkriptionsfaktoren ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) und ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox 2) [170]. In Meningeomen besteht ein Zusammenhang zwischen aberranter miRNA-Expression und der Expression von E-Cadherin [124]. Eine niedrige Expression der miR-200a führt zur Überexpression der Transkriptionsfaktoren ZEB1 und SIP1/ZEB2, die die Transkription von E-Cadherin reprimieren und in der Folge zu einer erniedrigten Proteinmenge von E-Cadherin. Die Inhibition der miR-200a führt *in vivo* zu verstärktem und invasivem Tumorwachstum [124]. Diese Ergebnisse zeigen, dass EMT entscheidend zur Progression und steigendem Tumorgrad in Meningeomen beizutragen scheint [51].

Die niedrige Expression weiterer deregulierter miRNAs in höhergradigen Meningeomen könnte ebenfalls den TGF- β Signalweg beeinflussen. Die TGF- β Rezeptoren *ALK7/ACVR1C* (activin A receptor type 1C) und *ALK5/TGFB β 1* (transforming growth factor beta receptor 1) sind validierte Zielgene der miR-376c [171, 172]. Der TGF- β Rezeptor *ACVR2A* (activin A receptor type 2A) ist ein validiertes Zielgen der miR-195 [173]. Eine Überexpression dieser Rezeptor-Proteine, aufgrund verminderter posttranskriptioneller miRNA-Regulation, könnte zu einer verstärkten Aktivierung des TGF- β Signalweges beitragen.

Zwei Gene, die in aggressiv wachsenden, benignen Meningeomen überexprimiert sind, *SPTBN1* (spectrin beta, non-erythrocytic 1) und *SCUBE3* (signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 3) [159], sind potentielle Zielgene der miR-376c. Nach Aktivierung des TGF- β Signalweges bindet SPTBN1 an SMAD3 und forciert den Transport des SMAD-Proteinkomplexes in den Zellkern und somit die Aktivierung der Transkription von Zielgenen [174]. Außerdem ist SPTBN1 Interaktionspartner von zwei Proteinen, NF2 und DAL-1, die mit einem frühen Stadium der Tumorgenese von Meningeomen assoziiert sind [22, 175]. Eine übermäßige Aktivierung des TGF- β Signalweges durch SCUBE3 in Lungenkarzinomen fördert dort die EMT und invasives Wachstum [176]. Die Überexpression dieser Proteine, die möglicherweise u.a. durch eine niedrige Expression der miR-376c hervorgerufen wird, könnte in Meningeomen mit EMT und verstärktem, invasivem Wachstum der Tumoren in Verbindung stehen.

5.3.2 Der Wnt/ β -Catenin Signalweg und FRAT1

Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges erfolgt nach Bindung von Liganden der Wnt-Familie am Rezeptor und aktiviert das Protein Dishevelled [177]. Dieses Protein ist ein Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase 3β (GSK- 3β), die eine Komponente des Axin/APC (adenomatous polyposis coli)/GSK- 3β Proteinkomplexes ist. Dieser Proteinkomplex bindet im Zytoplasma β -Catenin, phosphoryliert es, und markiert es hierdurch für den Abbau durch das Proteasom. Wird die GSK- 3β durch Dishevelled inhibiert, kommt es zur Erhöhung der Menge an freiem β -Catenin im Zytoplasma und zur Translokation in den Zellkern. Dort kommt es in der Folge zu einer Aktivierung von Zielgenen des β -Catenin/TCF (T-cell factor) Komplexes [177].

Proteine der FRAT-Familie sind exogene Aktivatoren des Wnt/ β -Catenin Signalweges [145]. Durch Bindung an die Glykogen-Synthase-Kinase 3β (GSK- 3β) inhibiert FRAT, wie Dishevelled, die Phosphorylierung und anschließende Degradierung von β -Catenin durch das Proteasom [145]. Dies erhöht, analog der Aktivierung des Signalweges über Liganden der Wnt-Familie am Rezeptor, die Menge an freiem β -Catenin im Zytoplasma, führt zu verstärkter Translokation von β -Catenin in den Zellkern und der Aktivierung von Zielgenen.

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Studien zum Einfluss von FRAT1 auf die Entstehung oder Progression von Meningeomen.

Abbildung 24 gibt einen Überblick, wie sich eine in höhergradigen Meningeomen erniedrigte Expression von miRNAs und damit Überexpression u.a. von FRAT1, auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg und seine Zielgene auswirken könnte.

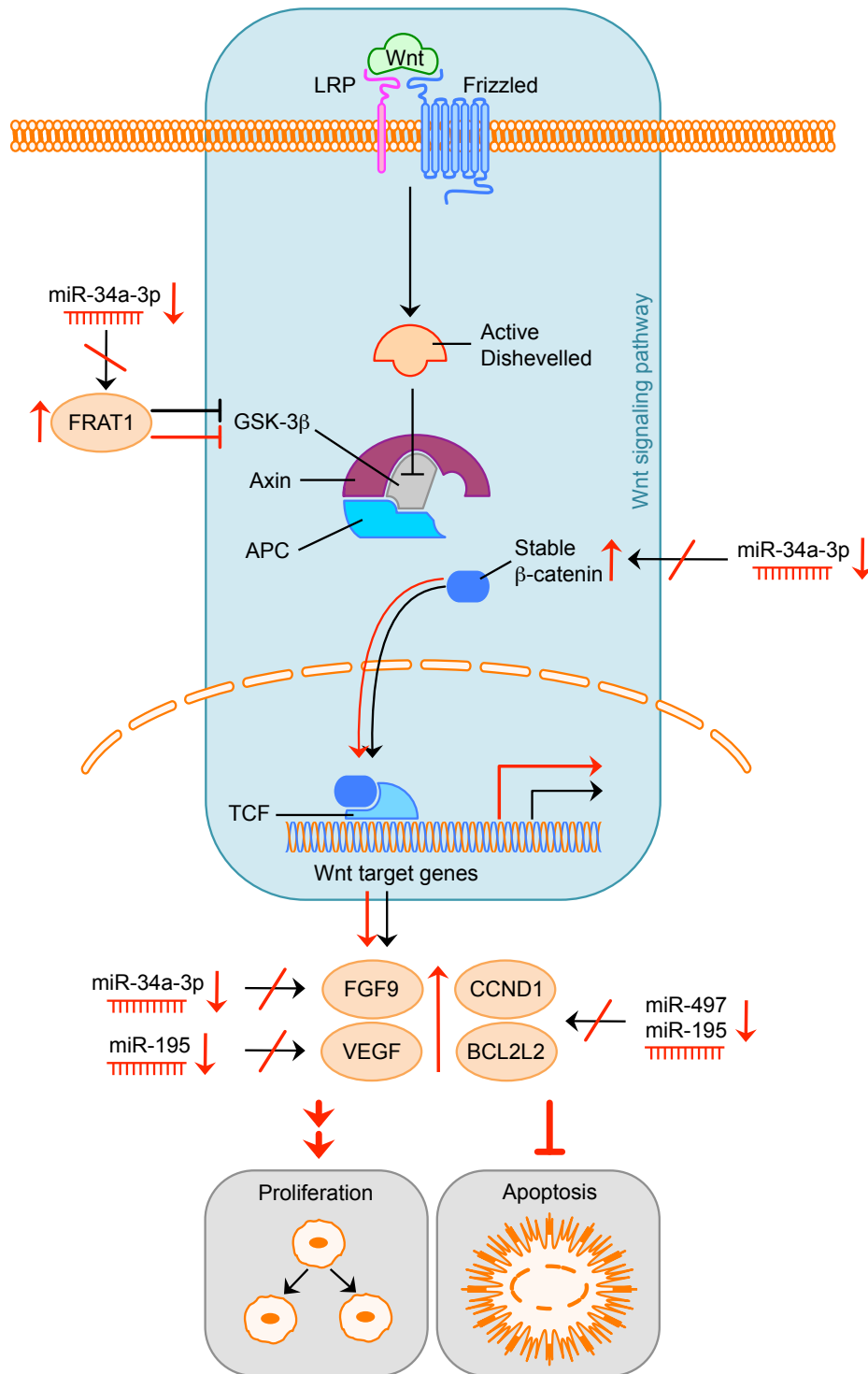


Abbildung 24: Mögliche Auswirkungen deregulierter miRNAs auf den Wnt/β-Catenin Signalweg und seine Zielgene. Der normale Ablauf des Signalweges nach Aktivierung durch Liganden der Wnt-Familie am Rezeptor wird durch schwarze Pfeile symbolisiert (spitze Pfeile: Aktivierung; flache Pfeile: Inhibition). Die möglichen Auswirkungen auf den Signalweg oder seine Zielgene, bedingt durch niedriger exprimierte miRNAs, werden durch rote Pfeile symbolisiert. Eine übermäßige Aktivierung des Wnt/β-Catenin Signalweges führt zu verstärkter Proliferation und Inhibition der Apoptose. LRP: low-density lipoprotein receptor-related protein; GSK-3β: glycogen synthase kinase 3β; APC: adenomatous polyposis coli; TCF: T-cell factor; FGF9: fibroblast growth factor 9; VEGF: vascular endothelial growth factor A; CCND1: Cyclin D1; BCL2L2: BCL2-like 2; FRAT1: Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1

Für verschiedene Tumoren wurden die Auswirkungen einer Überexpression oder Inhibition von FRAT1 bereits untersucht [178-184]. Beim Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre führt eine Überexpression von FRAT1, aufgrund einer Anreicherung von β -Catenin im Zellkern, zu verstärkter Proliferation der Tumorzellen und übermäßiger Aktivierung des β -Catenin/TCF Signalweges und der entsprechenden Zielgene [181]. Eine erhöhte Proteinmenge von β -Catenin und die Translokation an und in den Zellkern wurden auch in höhergradigen Meningeomen beobachtet [45, 46]. Man geht davon aus, dass dies eine Folge der verstärkten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges ist [39]. In Gliomen führt die Überexpression von FRAT1 zu erhöhter Malignität der Tumoren, gesteigerter Proliferation, einer erniedrigten Apoptoserate und einer schlechteren Prognose für die Patienten [179, 180]. In nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen korreliert die Überexpression von FRAT1 mit der Überexpression von β -Catenin, dem Differenzierungsgrad sowie dem Stadium der Tumoren und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen [183, 184]. Eine Inhibition der *FRAT1* Expression durch RNA-Interferenz führt in Glioblastom-Zellen zu einer Inhibition der Proliferation, Migration und Invasion [178]. In Zellen des Adenokarzinoms der Magenschleimhaut führt die Inhibition der *FRAT1* Expression zu einer verringerten Proliferation sowie zu vermehrter Apoptose [182].

Die Überexpression von FRAT1 führt, wie beschrieben, in unterschiedlichen Tumoren zu einer gesteigerten Proliferation und einer geringeren Apoptoserate. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen eine geringere Apoptoserate von Meningeomzellen *in vitro* nach Inhibition der miR-34a-3p und könnten auf eine Überexpression von FRAT1 zurückzuführen sein. Die Anreicherung von β -Catenin im Zellkern in höhergradigen Meningeomen könnte, neben der bereits bekannten Deregulation verschiedener Komponenten des Wnt/ β -Catenin Signalweges [45, 46], auch durch die fehlende posttranskriptionelle Regulation von *FRAT1* durch miR-34a-3p begünstigt werden.

Weiterhin ist β -Catenin selbst ein validiertes Zielgen der miR-34a-3p [158]. Eine niedrige Expression der miR-34a-3p könnte die aberrante Aktivierung der Transkription von Zielgenen des Wnt/ β -Catenin Signalweges durch Erhöhung der Proteinmenge von β -Catenin zusätzlich verstärken.

Einige Zielgene, deren Transkription durch den Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiviert wird, sind validierte Zielgene der in höhergradigen Meningeomen niedriger exprimierten miRNAs. So sind *BCL2L2* (BCL2-like 2) und *CCND1* (Cyclin D1) Zielgene der miR-195 und -497 [185-188] und *VEGF* (vascular endothelial growth factor A) ist Zielgen der miR-195 [189]. Die Überexpression von VEGF und *CCND1* korreliert in Meningeomen mit steigendem Tumorgrad [190, 191]. Eine niedrige Expression der miR-497 führt in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 zu einer Erhöhung der Proteinmenge von BCL2L2, was wiederum verringerte Apoptose und gesteigerte Zellproliferation zur Folge hat [185]. Die fehlende

posttranskriptionelle Regulation dieser Zielgene aufgrund der niedrigeren miRNA-Expression könnte in den höhergradigen Meningeomen die Auswirkungen der aberranten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges weiter verstärken. Dies könnte eine gesteigerte Proliferation und erniedrigte Apoptoserate der Tumorzellen zur Folge haben.

Ein weiteres Zielgen des Wnt/ β -Catenin Signalweges ist *FGF9* (fibroblast growth factor 9) [192], für das in der vorliegenden Arbeit eine posttranskriptionelle Regulation durch miR-34-3p auf Ebene der mRNA nachgewiesen werden konnte. In fibroblastischen Meningeomen ist *FGF9* im Vergleich zu Arachnothelzellen überexprimiert, mögliche Auswirkungen dieser Überexpression wurden jedoch nicht näher funktionell untersucht [193]. In der Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP führt die Stimulation mit FGF9 zu einer verstärkten Expression von N-Cadherin und VEGF [194]. Die Überexpression von FGF9, bedingt durch Induktion des Wnt/ β -Catenin Signalweges und fehlende posttranskriptionelle Regulation aufgrund der niedrigen Expression der miR-34a-3p, könnte eine Ursache für die beobachtete Überexpression von VEGF in Meningeomen [190] sein. Die verstärkte Expression von N-Cadherin als Marker mesenchymaler Zellen ist ein Vorgang während der EMT [168, 169]. Eine Überexpression von FGF9 in Meningeomen könnte zur Induktion der EMT und Progression der Tumoren beitragen.

Neben der nukleären Funktion als Koaktivator für die Transkription verschiedener Zielgene ist β -Catenin im Zytoplasma ein Bindungspartner von E-Cadherin [195]. Es bildet die Verbindung zwischen der Zellmembran und den Aktinfilamenten des Zytoskeletts und reguliert so Zell-Zell Kontakte [195]. In Meningeomen kommt es mit steigendem Tumorgrad zu erniedrigter Expression von E-Cadherin an der Zellmembran und invasivem Tumorwachstum [46, 124, 196]. In höhergradigen Meningeomen ist β -Catenin zwar überexprimiert, allerdings nur im Zellkern [45, 46]. An der Zellmembran hingegen liegt eine niedrigere Expression von β -Catenin vor [45, 46]. Da der Verlust von E-Cadherin sowie die Translokation von β -Catenin von der Zellmembran zum Zellkern zur Induktion der EMT beitragen [49, 50], ist auch aufgrund dieser Beobachtungen anzunehmen, dass EMT bei der Entstehung und Progression von Meningeomen eine Rolle spielt [51].

5.3.3 Der Apoptose-Signalweg und BCL2

Die Funktion von BCL2 als Inhibitor der Apoptose wurde in zahlreichen Studien untersucht und dokumentiert [148]. Im Apoptose-Signalweg blockiert BCL2 die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Die nachfolgende Signalkaskade wird nicht aktiviert, es kommt nicht zur Apoptose [148]

Abbildung 25 zeigt, welche Auswirkungen eine erniedrigte miRNA-Expression auf den Apoptose-Signalweg in Meningeomen haben könnte.

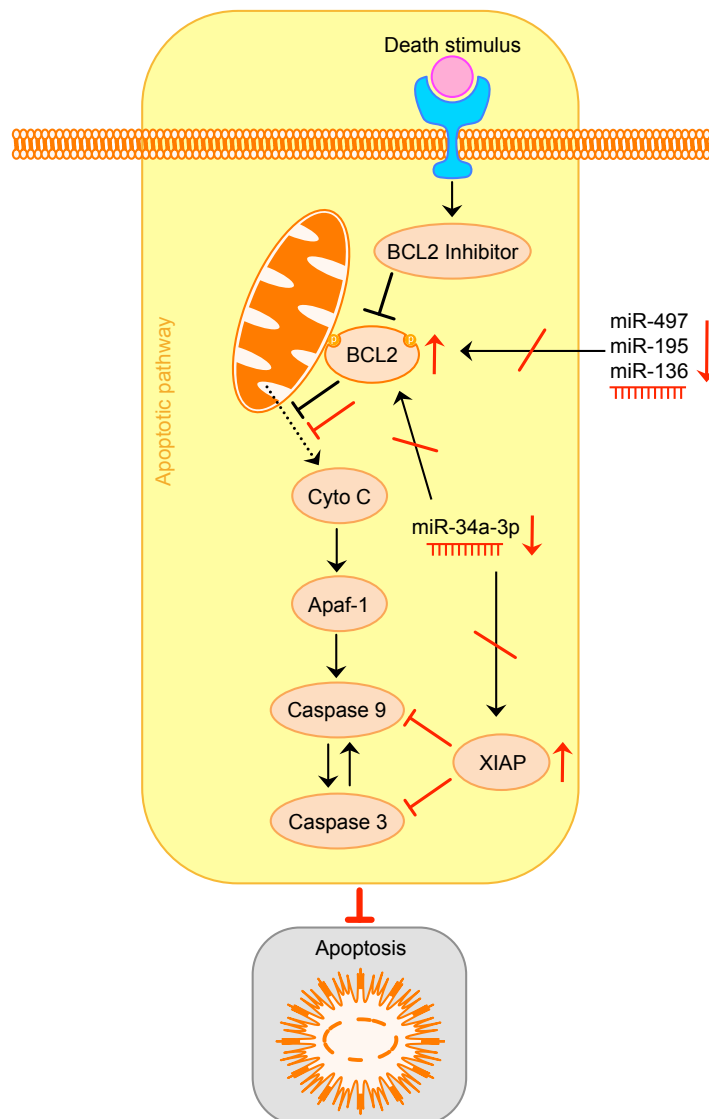


Abbildung 25: Mögliche Auswirkungen deregulierter miRNAs auf den Apoptose-Signalweg. Der normale Ablauf des Signalweges nach Aktivierung durch apoptotische Signale wird durch schwarze Pfeile symbolisiert (spitze Pfeile: Aktivierung; flache Pfeile: Inhibition). Die möglichen Auswirkungen auf den Signalweg, bedingt durch niedriger exprimierte miRNAs und Überexpression von BCL2 und XIAP, werden durch rote Pfeile symbolisiert. Eine Überexpression von BCL2 blockiert die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und führt so zur Inhibition der Apoptose. XIAP inhibiert Caspase 3 und Caspase 9 und greift so in die pro-apoptische Kaskade ein. Cyto C: Cytochrom C; Apaf-1: apoptotic peptidase activating factor 1; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis; BCL2: B-cell CLL/lymphoma 2

Der Apoptose-Inhibitor *BCL2* konnte als Zielgen der miR-34a-3p in der vorliegenden Arbeit validiert werden und ist zudem Zielgen dreier weiterer, in höhergradigen Meningeomen niedriger exprimierten miRNAs, nämlich miR-136, -195 und -497 [197-199]. Eine Überexpression von *BCL2*, aufgrund des Verlusts der posttranskriptionellen Regulation, könnte die Blockade des Apoptose-Signalweges durch *BCL2* verstärken und eine deutlich geringere Sensitivität der Tumorzellen für apoptotische Signale zur Folge haben. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der miR-34a-3p die Apoptoserate von Meningeomzellen *in vitro* reduziert, was diese Annahme unterstützt. Der anti-apoptotische Effekt auf Meningeomzellen aufgrund niedriger Expression der miR-34a-3p könnte durch *XIAP*, ein weiteres Zielgen der miR-34a-3p [157], unterstützt werden. *XIAP* ist ein Caspase-Inhibitor, der die pro-apoptotische Kaskade durch Bindung von Caspase 3 und Caspase 9 stoppt [200].

In Meningeomen hat *BCL2* Einfluss auf verschiedene Vorgänge, die mit der Entstehung und Progression der Tumoren in Zusammenhang stehen [201-203]. Eine Überexpression von *BCL2* im Tumor korreliert mit signifikant kürzeren Intervallen bis zum Auftreten von Tumorrezidiven und einem erhöhten Proliferationsindex [201, 203]. Meningeome, die außer einer partiellen oder kompletten Monosomie von Chromosom 22q keine chromosomalen Aberrationen aufweisen, die mit der Entstehung der Tumoren assoziiert sind [15], zeigen eine erhöhte Proteinmenge von *BCL2* [202].

Im Allgemeinen wurde die veränderte Expression weiterer pro- oder anti-apoptotischer Faktoren mit der Progression von Meningeomen assoziiert [204-206]. Caspase 3, ein Effektor des Apoptose-Signalweges, ist in höhergradigen Meningeomen niedriger exprimiert und mit dem frühen Auftreten von Tumorrezidiven assoziiert [205, 206]. Die Expression des anti-apoptotischen Proteins Survivin korreliert mit steigendem WHO Grad und der Neigung zu Tumorrezidiven [204].

Aktuelle Studien belegen, dass *BCL2*, neben der bekannten Schlüsselrolle im Apoptose-Signalweg, bei der Regulation von Migration, Invasion und Metastasierung verschiedener Tumoren eine Rolle spielt [149]. Hierzu gehören Gliome [207, 208], Plattenepithelkarzinome [209], Neuroblastome [210] und Karzinome der Lunge [211] und des Dickdarms [212]. Die Überexpression von *BCL2* führt in diesen Tumoren zu einer Induktion der Expression verschiedener Enzyme, die die Auflösung von Zell-Zell Verbindungen katalysieren, u.a. der Matrixmetalloproteasen (MMP)-2 und -9 [149]. Bei Gliomen wird die Expression der MMPs über den Furin/TGF- β Signalweg und bei Plattenepithelkarzinomen über den N-Cadherin/FGF-Rezeptor/MAPK-Signalweg induziert [208, 209].

Die Überexpression von *BCL2* führt in Meningeomen zu verkürzten Intervallen bis zum Auftreten von Tumorrezidiven und einer gesteigerten Proliferation [201-203]. Außerdem ist *BCL2* validiertes Zielgen von vier in höhergradigen Meningeomen niedriger exprimierten

miRNAs. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass BCL2 eine wichtige Rolle bei der Progression von Meningeomen spielt. Eine Überexpression von BCL2 könnte zu einer Reduktion der Apoptose, invasivem Wachstum und Migration von Tumorzellen, insbesondere in höhergradigen Meningeomen, beitragen.

5.3.4 miRNA-Zielgene und die RB/p53 Signalwege

In Meningeomen führt der Funktionsverlust der Tumorsuppressoren p15, p16 und p14^{ARF}, die auf Chromosom 9p21 kodiert sind, zur Deregulation der RB/p53 Signalwege und zur Progression der Tumoren [32, 39]. Die Proteine p15 und p16 inhibieren den Cyclin D1/CDK4 Komplex, verhindern so die übermäßige Phosphorylierung des Tumorsuppressor-Proteins Rb1 und in der Folge die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Diese steuern u.a. die Transkription von Zielgenen, die den Übergang von der G₁ in die S-Phase des Zellzyklus regulieren. Der Funktionsverlust von p15 und p16 führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von Rb1, der Freisetzung von E2F und in der Folge zur verstärkten Transkription von Zielgenen und der Aktivierung des Zellzyklus [32, 39]. Der Tumorsuppressor p53 wirkt inhibierend auf den Zellzyklus, indem er den Übergang von der G₁ in die S-Phase stoppt, wenn die Zelle z.B. DNA-Schäden aufweist [213]. Eine weitere Funktion von p53 ist die Induktion der Apoptose über die Aktivierung der Expression pro-apoptotischer Proteine wie BAX (BCL2 associated X, apoptosis regulator), BBC3/PUMA (BCL2 binding component 3) und Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor). Diese verstärken die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und die Aktivierung der apoptotischen Kaskade. Beide Mechanismen tragen entscheidend dazu bei, die Entstehung und Progression von Tumoren zu verhindern [213]. Das Protein p14^{ARF}, eine alternative Transkriptvariante des *CDKN2A*-Gens, ist ein Zielgen des RB Signalweges [32, 39]. Es inhibiert MDM2, den Inhibitor von p53, und aktiviert so p53. Durch den Funktionsverlust von p14^{ARF} wird p53 nicht aktiviert und die Zellzykluskontrolle am Übergang von der G₁ zur S-Phase bleibt aus [32, 39].

Abbildung 26 gibt einen Überblick, wie eine verminderte Expression von miRNAs und der Funktionsverlust von Tumorsuppressoren zu einer Deregulation der RB/p53 Signalwege beitragen könnte.

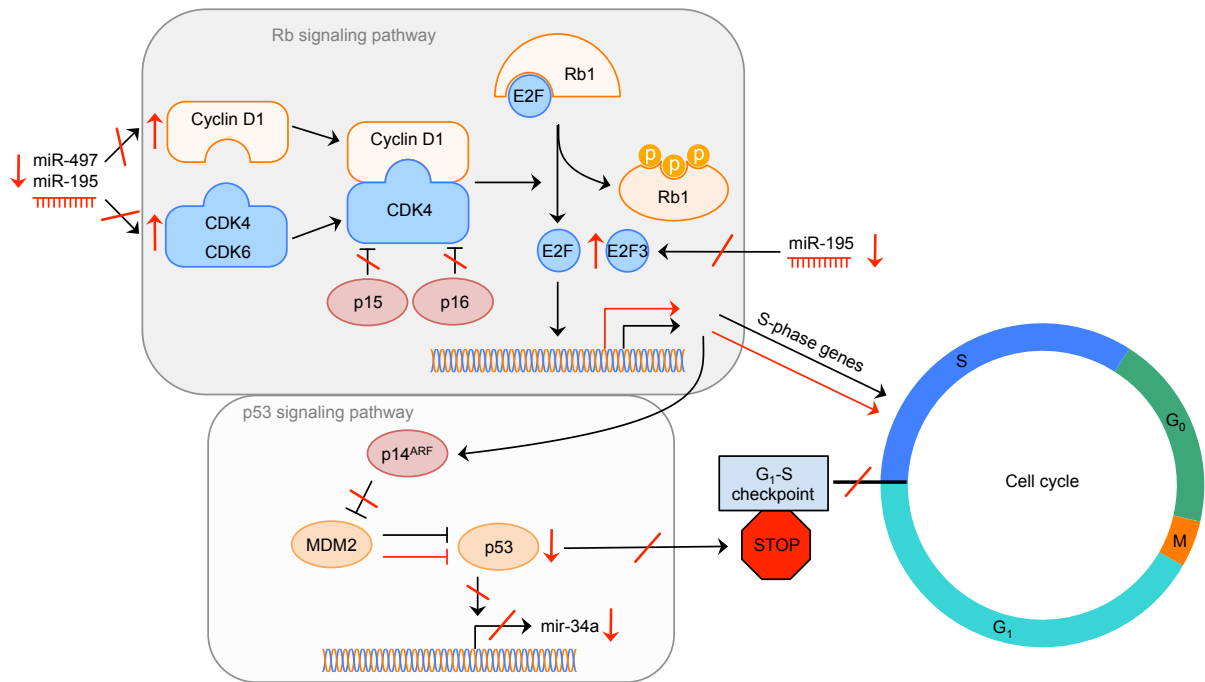


Abbildung 26: Mögliche Auswirkungen deregulierter miRNAs und der Aberrationen von Chromosom 9p auf die RB/p53 Signalwege. Der normale Ablauf der Signalwege wird durch schwarze Pfeile symbolisiert (spitze Pfeile: Aktivierung; flache Pfeile: Inhibition). Die möglichen Auswirkungen auf die Signalwege durch Deregulation von miRNAs und dem Funktionsverlust von Tumorsuppressoren werden durch rote Pfeile symbolisiert. CDK4: cyclin-dependent kinase 4; CDK6: cyclin-dependent kinase 6; Rb1: retinoblastoma 1; MDM2: murine double minute 2; E2F3: E2F transcription factor 3

Mehrere Komponenten des Cyclin D/CDK Komplexes sind validierte Zielgene von in höhergradigen Meningeomen niedriger exprimierten miRNAs. Cyclin D1 (*CCND1*), *CDK4* (cyclin-dependent kinase 4) und *CDK6* (cyclin-dependent kinase 6) sind Zielgene der miR-195 und -497 [187, 188, 214, 215]. In Meningeomen ist *CCND1* mit steigendem Tumorgrad überexprimiert [191]. Die Überexpression von CDK6 und Rb1 sowie eine erniedrigte Expression von p16 korrelieren in atypischen Meningeomen mit einem früheren Auftreten von Tumorrezidiven [216]. Eine Überexpression dieser Zellzyklusproteine, bedingt durch fehlende posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs, könnte zu verstärkter Proliferation und Progression in Meningeomen beitragen. Die Auswirkungen der Deregulation des RB Signalweges durch miRNAs könnten in Kombination mit dem Funktionsverlust von p15 und p16 zusätzlich verstärkt werden, da die Inhibition des Cyclin D1/CDK4 Komplexes ausbleibt.

Ein weiteres validiertes Zielgen der miR-34a-3p ist der Transkriptionsfaktor *JUN* (Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit) [156]. Eine Überexpression von JUN durch niedrige Expression von miR-34a-3p könnte über mehrere Mechanismen zur Deregulation der RB/p53 Signalwege beitragen. Als Koaktivator für die Transkription von Cyclin D1 induziert bzw. reguliert JUN die Transkription von Zielgenen für den Übergang von der G₁ in

die S-Phase des Zellzyklus [217]. Außerdem reguliert JUN die Expression von p53, bei Überexpression von JUN wird p53 reprimiert [218]. Die Überexpression von JUN könnte, zusätzlich zur Überexpression von weiteren Komponenten des RB Signalweges und einer fehlenden Zellzykluskontrolle durch p53, zur aberranten Aktivierung des Zellzyklus, gesteigerter Proliferation und damit der Progression von Meningeomen beitragen.

Ein Transkriptionsfaktor der E2F-Familie, der durch Phosphorylierung von Rb1 aktiviert wird, *E2F3* (E2F transcription factor 3), ist Zielgen der miR-195 [215]. In fibroblastischen Meningeomen ist *E2F3* im Vergleich zu Arachnothelzellen überexprimiert [193]. Ein Verlust der posttranskriptionellen Regulation von *E2F3* könnte zur übermäßigen Aktivierung der Transkription von Zielgenen des RB Signalweges und des Zellzyklus beitragen.

Der Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression des kodierenden Gens für miR-34a [219]. Eine verminderte Aktivität von p53 könnte eine Ursache für die erniedrigte Expression der miR-34a-3p in höhergradigen Meningeomen sein.

5.4 Weitere miRNA-Zielgene mit Einfluss auf Entstehung und Progression von Meningeomen

Einige Zielgene der in höhergradigen Meningeomen signifikant niedriger exprimierten miRNAs miR-195, -497 und -376c kodieren für Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren. Die Aktivierung verschiedener Rezeptoren und Wachstumsfaktoren ist ein häufiges Merkmal bei Tumoren, u.a. auch bei Meningeomen [220].

Der Rezeptor *IGF1R* (insulin like growth factor 1 receptor) ist validiertes Zielgen der miR-497 und -376c [221, 222]. Eine Überexpression verschiedener Rezeptoren und Liganden des Insulin-Wachstumsfaktorsystems konnte bereits mit einer erhöhten Proliferation und der Progression von Meningeomen in Verbindung gebracht werden [191]. In fibroblastischen, anaplastischen und benignen Meningeomen mit einem klinisch auffälligen, aggressiven Wachstumsverhalten ist *IGF1R* überexprimiert [159, 193]. In primären Schwann'schen Zellen und Schwannomen reguliert Merlin, das Produkt des *NF2*-Gens, die über Zell-Zell Kontakte vermittelten Wachstumssignale durch Inhibition der Expression u.a. von IGF1R an der Zelloberfläche [223]. Für Meningeome ist bekannt, dass es durch Verlust der Heterozygotie von *NF2* und Mutationen im verbleibenden *NF2*-Genlokus zur verminderten oder fehlerhaften Expression von Merlin kommt [15-18]. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass eine Überexpression von IGF1R, zum einen durch fehlende posttranskriptionelle Regulation von miR-497 und -376c bedingt sein könnte, zum anderen durch den Funktionsverlust von Merlin. Beide Faktoren könnten somit zur Entstehung und Progression von Meningeomen beitragen.

Der Wachstumsfaktor *HDGF* (hepatoma-derived growth factor) ist validiertes Zielgen der miR-497 [224]. In Brust- und Prostatakarzinomen führt eine Überexpression von HDGF zu verstärkter Zellproliferation sowie erhöhter Migration und Invasion der Tumorzellen in umliegende Gewebe [225]. Verstärkte Proliferation und Invasion in umliegende Gewebe sind auch Kennzeichen höhergradiger Meningeome [5, 6]. In Dickdarmkrebs wurde gezeigt, dass HDGF ein Transkriptionsaktivator für β -Catenin ist, und die Überexpression beider Proteine korreliert [226]. Die verminderte Expression der miR-497 und in der Folge eine Überexpression von HDGF könnte zur bereits zuvor angesprochenen Überexpression von β -Catenin und zur Progression in höhergradigen Meningeomen beitragen [45, 46].

Die Wachstumsfaktoren *TGF α* (transforming growth factor alpha) und *GRB2* (growth factor receptor bound protein 2) sind validierte Zielgene der miR-376c [227, 228]. Beide Proteine sind Liganden des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors und ihre Überexpression steht mit gesteigerter Proliferation und Progression von Meningeomen in Zusammenhang [191, 229]. Für beide Proteine wurde eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese aufgrund einer Überexpression durch fehlende posttranskriptionelle miRNA-Regulation gezeigt [230, 231]. Die Überexpression von TGF α führt bei Lungenkarzinomen aufgrund niedriger Expression der miR-374a zu gesteigerter Zellproliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen [231]. Eine Überexpression von GRB2, bedingt durch niedrige Expression der miR-329, führt bei Pankreaskarzinomen *in vitro* und *in vivo* zu verstärkter Proliferation und einer geringeren Apoptoserate [230]. Die Überexpression von TGF α und GRB2 könnte eine Folge der verminderten Expression der miR-376c in höhergradigen Meningeomen sein. Eine erhöhte Proliferation und Invasion treten auch bei höhergradigen Meningeomen auf [5, 6], und könnten eine Konsequenz der erniedrigten miRNA-Expression sein.

Der Wachstumsfaktor *VEGF* (vascular endothelial growth factor A) ist validiertes Zielgen der miR-195 [189]. In Meningeomen spielt VEGF eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese und der Entstehung peritumoraler Ödeme [40]. Die Überexpression von VEGF korreliert mit dem Schweregrad peritumoraler Ödeme, der Neovaskularisation im Tumor sowie der Neigung zu Tumorrezidiven [232, 233]. Die genauen Mechanismen, wie es zur Überexpression von VEGF in Meningeomen kommt, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannte Ursachen sind die Überexpression verschiedener Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) und PDGF (platelet-derived growth factor) [234, 235]. Eine Hypoxie, d.h. eine Mangelversorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff, induziert die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 (hypoxia inducible factor 1), der wiederum die Transkription von VEGF induziert [236]. Die fehlende posttranskriptionelle Regulation durch miR-195 kann als weitere Ursache für eine VEGF Überexpression in Betracht gezogen werden.

Aktuelle Studien belegen, dass ein veränderter Zellstoffwechsel in höhergradigen Meningeomen und aggressiv wachsenden, benignen Meningeomen zur Progression der Tumoren beizutragen scheint [159, 237]. Kennzeichen hierfür sind veränderte Mengen an Stoffwechselmetaboliten, die mit einer erhöhten Synthese und einem erhöhten Umsatz von Membranproteinen, der Proliferation, einem gesteigerten Energieverbrauch und der Hypoxie in Verbindung gebracht werden können [159, 237]. Das Enzym *FASN* (fatty acid synthase) ist validiertes Zielgen der miR-195 [238]. In vielen Tumoren ist *FASN* ein Schlüsselenzym für die Synthese von Membranlipiden, die bei erhöhter Zellproliferation vermehrt benötigt werden [239]. In höhergradigen und rezidivierenden WHO Grad I Meningeomen ist *FASN* überexprimiert [240, 241]. Zwei potentielle Zielgene der miR-376c, *AK3* (adenylate kinase 3) und *UGP2* (UDP-glucose pyrophosphorylase 2), sind in Meningeomen auf Proteinebene überexprimiert [160]. Die *AK3* ist ein mitochondriales Enzym der ATP-Synthesekette. Eine Überexpression könnte mit einem erhöhten Energiebedarf der Tumorzellen, u.a. während der Proliferation, in Zusammenhang stehen [242]. Bei der chronischen lymphatischen Leukämie führt eine Reprimierung der *AK3*-Expression zur Inhibition der Proliferation [243]. Eine Hypoxie induziert verschiedene Enzyme des Glycogen-Stoffwechsels, zu denen auch *UGP2* gehört [244]. Die Deregulation des Fettsäure- und Energiestoffwechsels in Meningeomen könnte durch die differentielle Expression von miRNAs beeinflusst werden. Eine Hypermethylierung von Promotoren wurde vor allem in atypischen und anaplastischen Meningeomen beobachtet, was für eine wesentliche Bedeutung epigenetischer Modifikationen bei der Progression von Meningeomen spricht [41]. Eine Hypermethylierung von Promotoren führt in Meningeomen bei zwei potentiellen Tumorsuppressor-Genen, *MEG3* und *NDRG2*, zu einer verminderten Expression [30, 31]. Ein validiertes Zielgen der miR-195 ist *MBD1* (methyl-CpG binding domain protein 1) [245]. *MBD1* ist an der Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung und somit der durch epigenetische Modifikationen bedingten Repression der Transkription beteiligt [246]. Eine Überexpression von *MBD1*, durch fehlende posttranskriptionelle Regulation der miR-195 in höhergradigen Meningeomen, könnte eine Ursache für die Hypermethylierung verschiedener Promotoren sein. Ein Knockout von *MBD1* führt zur verstärkten Expression verschiedener miRNAs in neuronalen Stammzellen, zu denen auch die miR-195 gehört [246]. Umgekehrt könnte somit die Überexpression von *MBD1* eine Ursache für die erniedrigte Expression verschiedener miRNAs in höhergradigen Meningeomen sein.

5.5 Kooperative Effekte der miR-34a-3p und miR-34a-5p auf Zielgene

Die Funktion und Bedeutung von miRNAs wurde in zahlreichen Studien der letzten Jahre untersucht, wobei der Fokus zumeist auf dem vermeintlich ausschließlich aktiven -5p Strang der jeweiligen miRNAs lag. Die Expression und Funktion der -5p und -3p Stränge von miRNAs kann gewebespezifisch unterschiedlich sein und unterschiedliche Einflüsse auf den Organismus ausüben [94, 247].

Dass beide Stränge einer pre-miRNA regulatorisch aktiv sein können, wurde in aktuellen Studien für verschiedene miRNAs gezeigt [248, 249]. Der -3p Strang der miR-21 hat ein ähnliches onkogenes Potential wie der -5p Strang [248], dessen Funktion als onko-miRNA in zahlreichen Tumoren belegt ist [107]. Die miR-200b-5p und miR-200b-3p greifen in den gleichen Signalweg ein, der die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in Brustkrebszellen reguliert [249]. Bereits im Jahr 2011 wurde aufgrund bioinformatischer Analysen, die eine hohe Konservierung der kodierenden Sequenz für die miR-34a in verschiedenen Vertebraten zeigten, auch für diese miRNA angenommen, dass sowohl der -5p als auch der -3p Strang regulatorisch aktiv sind [250].

Das Zytokin *TNF* (tumor necrosis factor) wird von beiden Strängen der miR-34a, miR-34a-3p und miR-34a-5p, posttranskriptionell reguliert [156]. Die in der vorliegenden Arbeit für miR-34a-3p validierten Zielgene *SMAD4* und *BCL2* sind beide ebenfalls bereits validierte Zielgene der miR-34a-5p [251, 252].

Eine Überexpression der miR-34a-5p und damit Repression von *SMAD4* unterdrückt in Tumoren des Gallenganges die über den TGF- β Signalweg induzierte EMT [251]. Eine mögliche Konsequenz einer Deregulation des TGF- β Signalweges durch niedrige Expression der miR-34a-3p könnte, wie zuvor diskutiert, ebenfalls die Induktion der EMT sein.

Patienten mit Leberkarzinomen mit einer niedrigen Expression der miR-34a-5p und Überexpression von *BCL2* im Tumor haben signifikant kürzere Überlebenszeiten [252]. Eine Überexpression der miR-34a-5p *in vitro* reduziert die Viabilität von Leberkarzinom-Zellen und fördert Apoptose, was die Tumorsuppressor-Aktivität der miR-34a-5p bestätigt [252]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten sehr ähnliche Resultate für die Auswirkungen einer Überexpression der miR-34a-3p in Meningeomzellen, auch hier kam es tendenziell zu mehr Apoptose und einer signifikant niedrigeren Proliferation. Weiterhin haben auch Meningeompatienten mit einer hohen Expression von *BCL2* im Tumor, bedingt durch früheres Auftreten von Tumorrezidiven, eine schlechtere Prognose [201].

Aufgrund dieser Studien und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann spekuliert werden, dass der Verlust der posttranskriptionellen Regulation von *SMAD4* und *BCL2* durch niedrige Expression der miR-34a-3p in höhergradigen Meningeomen ähnliche Auswirkungen auf die EMT und Zellviabilität hat. Die Ergebnisse der miRNA-Expressionsanalyse mittels

Microarrays, die Grundlage der vorliegenden Arbeit waren, zeigten auch eine signifikant niedrigere Expression der miR-34a-5p in höhergradigen Meningeomen [143]. Möglicherweise bestehen kooperative Effekte der miR-34a-3p und -5p auf miRNA-Zielgene in Meningeomen.

5.6 Ausblick

Anhand eines miRNA-Expressionsprofils und der nachfolgenden Validierung mittels RT-qPCR konnte für fünf miRNAs (miR-34a-3p, -136, -195, -497 und -376c) eine signifikant niedrigere Expression in höhergradigen Meningeomen gezeigt werden. Für eine ausgewählte miRNA, miR-34a-3p, konnten drei potentielle Zielgene (*SMAD4*, *FRAT1* und *BCL2*) mittels Luciferase-Assays und Western-Blots validiert werden. Auf Grundlage dieser drei neu experimentell validierten Zielgene für miR-34a-3p und ihrem potentiellen Einfluss auf deregulierte zelluläre Signalwege in Meningeomen ergibt sich ein Einblick, wie eine differentiell exprimierte miRNA zu dieser Deregulation beitragen könnte. Anhand von weiteren validierten oder potentiellen Zielgenen, der ebenfalls in höhergradigen Meningeomen niedriger exprimierten miRNAs, wurden zahlreiche weitere Einflüsse auf deregulierte zelluläre Signalwege oder andere Konsequenzen einer fehlenden posttranskriptionellen Regulation von Zielgenen durch miRNAs diskutiert, die die Entstehung und Progression von Meningeomen beeinflussen könnten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu Auswirkungen der Deregulation der miR-34a-3p in Meningeomzellen *in vitro* haben gezeigt, dass bereits die Deregulation einer einzelnen miRNA zu signifikanten Veränderungen der Proliferation und Apoptose von Tumorzellen führen kann.

In anschließenden Experimenten könnten die Auswirkungen der Deregulation, weiterer in höhergradigen Meningeomen differentiell exprimierter miRNAs, auf Basis der *in vitro* Zellkultur untersucht werden. Neben den Auswirkungen der Deregulation einer einzelnen miRNA könnten auch die Auswirkungen der Deregulation mehrerer miRNAs gleichzeitig untersucht werden. Das Beispiel von *BCL2*, das Zielgen von vier in höhergradigen Meningeomen niedriger exprimierten miRNAs ist, lässt vermuten, dass bei Deregulation von mehreren miRNAs deutliche Auswirkungen zu erwarten sein könnten.

Auf Grundlage der zuvor diskutierten Beobachtungen kooperativer Effekte von -5p und -3p miRNAs auf das gleiche Zielgen könnten kooperative Effekte der miR-34a-5p und -3p untersucht werden. *SMAD4* und *BCL2* sind bereits validierte Zielgene der miR-34a-5p und wurden als Zielgene der miR-34a-3p in der vorliegenden Arbeit bestätigt. In den durchgeführten Experimenten wurden die 3'UTR Fragmente gezielt unter Ausschluss von Bindestellen für miR-34a-5p kloniert. In weiteren Experimenten könnte man mögliche

kooperative Effekte durch gezielte Klonierung und Mutagenese von Bindestellen für miR-34a-5p und miR-34a-3p näher untersuchen.

Im Überblick der bereits validierten Zielgene für die fünf in höhergradigen Meningeomen differentiell exprimierten miRNAs fällt außerdem auf, dass für miR-195 und miR-497 bereits zahlreiche Zielgene validiert wurden, während dies für miR-136, -376c und -34a-3p deutlich weniger sind [143]. Auf Gen- oder Proteinebene wurde die Überexpression einiger potentieller Zielgene dieser deregulierten miRNAs gezeigt [143, 159, 160]. Basierend auf diesen Studien und zahlreichen vorhergesagten Zielgenen für diese miRNAs könnten weitere Zielgene validiert werden, die bei der Deregulation zellulärer Signalwege und der Entstehung bzw. Progression von Meningeomen eine Rolle spielen könnten.

6. Literaturverzeichnis

1. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C (2012) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 14 Suppl 5: v1-49.
2. Perry A LD, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A (2007), Meningiomas, in *WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System*, O.H. Louis DN, Wiestler OD, Cavenee WK, Editor., IARC press: Lyon. 164-172.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, *et al.* (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109.
4. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, *et al.* (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131: 803-20.
5. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G (2006) Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol* 5: 1045-54.
6. Y. Kim NB, R. Ketter, W. Henn, W. Feiden (2008) Meningeome - Multiparametrische Risikostratifizierung und Grading. *Der Pathologe* 6: 428-433.
7. Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC (1999) "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 85: 2046-56.
8. Ketter R, Rahnenfuhrer J, Henn W, Kim YJ, Feiden W, Steudel WI, *et al.* (2008) Correspondence of tumor localization with tumor recurrence and cytogenetic progression in meningiomas. *Neurosurgery* 62: 61-9; discussion 69-70.
9. McCarthy BJ, Davis FG, Freels S, Surawicz TS, Damek DM, Grutsch J, *et al.* (1998) Factors associated with survival in patients with meningioma. *J Neurosurg* 88: 831-9.
10. Oya S, Kawai K, Nakatomi H, Saito N (2012) Significance of Simpson grading system in modern meningioma surgery: integration of the grade with MIB-1 labeling index as a key to predict the recurrence of WHO Grade I meningiomas. *J Neurosurg* 117: 121-8.
11. Simpson D (1957) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20: 22-39.
12. Weber RG, Bostrom J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, *et al.* (1997) Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14719-24.
13. Ragel BT, Jensen RL (2005) Molecular genetics of meningiomas. *Neurosurg Focus* 19: E9.
14. Rouleau GA, Wertelecki W, Haines JL, Hobbs WJ, Trofatter JA, Seizinger BR, *et al.* (1987) Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 329: 246-8.

15. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, *et al.* (1994) Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 6: 180-4.
16. Pecina-Slaus N (2013) Merlin, the NF2 gene product. *Pathol Oncol Res* 19: 365-73.
17. Ueki K, Wen-Bin C, Narita Y, Asai A, Kirino T (1999) Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* 59: 5995-8.
18. Lomas J, Bello MJ, Arjona D, Alonso ME, Martinez-Glez V, Lopez-Marin I, *et al.* (2005) Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 42: 314-9.
19. Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellstrom AR, Mantripragada K, *et al.* (2007) Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 8: 16.
20. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, *et al.* (1995) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146: 827-32.
21. Gerber MA, Bahr SM, Gutmann DH (2006) Protein 4.1B/differentially expressed in adenocarcinoma of the lung-1 functions as a growth suppressor in meningioma cells by activating Rac1-dependent c-Jun-NH(2)-kinase signaling. *Cancer Res* 66: 5295-303.
22. Robb VA, Gerber MA, Hart-Mahon EK, Gutmann DH (2005) Membrane localization of the U2 domain of Protein 4.1B is necessary and sufficient for meningioma growth suppression. *Oncogene* 24: 1946-57.
23. Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, *et al.* (2000) Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet* 9: 1495-500.
24. Gutmann DH, Hirbe AC, Huang ZY, Haipok CA (2001) The protein 4.1 tumor suppressor, DAL-1, impairs cell motility, but regulates proliferation in a cell-type-specific fashion. *Neurobiol Dis* 8: 266-78.
25. Nunes F, Shen Y, Niida Y, Beauchamp R, Stemmer-Rachamimov AO, Ramesh V, *et al.* (2005) Inactivation patterns of NF2 and DAL-1/4.1B (EPB41L3) in sporadic meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 162: 135-9.
26. Barski D, Wolter M, Reifemberger G, Riemenschneider MJ (2010) Hypermethylation and transcriptional downregulation of the TIMP3 gene is associated with allelic loss on 22q12.3 and malignancy in meningiomas. *Brain Pathol* 20: 623-31.
27. Lamszus K (2004) Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 275-86.
28. Ketter R, Henn W, Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, Konig J, Zang KD, *et al.* (2001) Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg* 95: 601-7.

29. Cai DX, Banerjee R, Scheithauer BW, Lohse CM, Kleinschmidt-Demasters BK, Perry A (2001) Chromosome 1p and 14q FISH analysis in clinicopathologic subsets of meningioma: diagnostic and prognostic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 628-36.
30. Zhang X, Gejman R, Mahta A, Zhong Y, Rice KA, Zhou Y, *et al.* (2010) Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression. *Cancer Res* 70: 2350-8.
31. Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, *et al.* (2005) Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res* 65: 7121-6.
32. Bostrom J, Meyer-Puttitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, *et al.* (2001) Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol* 159: 661-9.
33. Perry A, Banerjee R, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Scheithauer BW (2002) A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas. *Brain Pathol* 12: 183-90.
34. Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET (1997) Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 86: 113-20.
35. Lusis EA, Scheithauer BW, Yachnis AT, Fischer BR, Chicoine MR, Paulus W, *et al.* (2012) Meningiomas in pregnancy: a clinicopathologic study of 17 cases. *Neurosurgery* 71: 951-61.
36. Rao G, Giordano SH, Liu J, McCutcheon IE (2009) The association of breast cancer and meningioma in men and women. *Neurosurgery* 65: 483-9; discussion 489.
37. Konstantinidou AE, Korkolopoulou P, Mahera H, Kotsiakis X, Hranioti S, Eftychiadis C, *et al.* (2003) Hormone receptors in non-malignant meningiomas correlate with apoptosis, cell proliferation and recurrence-free survival. *Histopathology* 43: 280-90.
38. Giancotti FG (2014) Deregulation of cell signaling in cancer. *FEBS Lett* 588: 2558-70.
39. Domingues P, Gonzalez-Tablas M, Otero A, Pascual D, Ruiz L, Miranda D, *et al.* (2015) Genetic/molecular alterations of meningiomas and the signaling pathways targeted. *Oncotarget* 6: 10671-88.
40. Ragel BT, Jensen RL (2010) Aberrant signaling pathways in meningiomas. *J Neurooncol* 99: 315-24.
41. Liu Y, Pang JC, Dong S, Mao B, Poon WS, Ng HK (2005) Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol* 36: 416-25.
42. Johnson M, Toms S (2005) Mitogenic signal transduction pathways in meningiomas: novel targets for meningioma chemotherapy? *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 1029-36.
43. Johnson MD, O'Connell MJ, Pilcher W, Reeder JE (2010) Fibroblast growth factor receptor-3 expression in meningiomas with stimulation of proliferation by the phosphoinositide 3 kinase-Akt pathway. *J Neurosurg* 112: 934-9.

44. Mawrin C, Sasse T, Kirches E, Kropf S, Schneider T, Grimm C, *et al.* (2005) Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas. *Clin Cancer Res* 11: 4074-82.
45. Pecina-Slaus N, Nikuseva Martic T, Deak AJ, Zeljko M, Hrascan R, Tomas D, *et al.* (2010) Genetic and protein changes of E-cadherin in meningiomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 695-702.
46. Zhou K, Wang G, Wang Y, Jin H, Yang S, Liu C (2010) The potential involvement of E-cadherin and beta-catenins in meningioma. *PLoS One* 5: e11231.
47. Zhou L, Ercolano E, Ammoun S, Schmid MC, Barczyk MA, Hanemann CO (2011) Merlin-deficient human tumors show loss of contact inhibition and activation of Wnt/beta-catenin signaling linked to the PDGFR/Src and Rac/PAK pathways. *Neoplasia* 13: 1101-12.
48. Ghahhari NM, Babashah S (2015) Interplay between microRNAs and WNT/beta-catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Eur J Cancer* 51: 1638-49.
49. Lehembre F, Yilmaz M, Wicki A, Schomber T, Strittmatter K, Ziegler D, *et al.* (2008) NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *EMBO J* 27: 2603-15.
50. Azmi AS (2013) Unveiling the role of nuclear transport in epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Cancer Drug Targets* 13: 906-14.
51. Pecina-Slaus N, Cicvara-Pecina T, Kafka A (2012) Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 889-96.
52. Heldin CH, Moustakas A (2012) Role of Smads in TGFbeta signaling. *Cell Tissue Res* 347: 21-36.
53. Wendt MK, Tian M, Schiemann WP (2012) Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF-beta-induced EMT during cancer progression. *Cell Tissue Res* 347: 85-101.
54. Johnson MD, Okediji E, Woodard A (2004) Transforming growth factor-beta effects on meningioma cell proliferation and signal transduction pathways. *J Neurooncol* 66: 9-16.
55. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-54.
56. Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-62.
57. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, *et al.* (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-6.
58. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5: 659-69.

59. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, *et al.* (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408: 86-9.
60. Ruvkun G (2001) Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294: 797-9.
61. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-8.
62. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858-62.
63. Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-4.
64. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-97.
65. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP (2003) Vertebrate microRNA genes. *Science* 299: 1540.
66. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, *et al.* (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-9.
67. Griffiths-Jones S (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32: D109-11.
68. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36: D154-8.
69. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34: D140-4.
70. Piva R, Spandidos DA, Gambari R (2013) From microRNA functions to microRNA therapeutics: novel targets and novel drugs in breast cancer research and treatment (Review). *Int J Oncol* 43: 985-94.
71. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ (2007) Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17719-24.
72. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, *et al.* (2010) The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 19: 3566-82.
73. Glazov EA, McWilliam S, Barris WC, Dalrymple BP (2008) Origin, evolution, and biological role of miRNA cluster in DLK-DIO3 genomic region in placental mammals. *Mol Biol Evol* 25: 939-48.
74. da Rocha ST, Edwards CA, Ito M, Ogata T, Ferguson-Smith AC (2008) Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain. *Trends Genet* 24: 306-16.
75. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, *et al.* (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-60.

76. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, *et al.* (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432: 235-40.
77. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18: 3016-27.
78. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-8.
79. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17: 3011-6.
80. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, *et al.* (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-4.
81. Saito K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC (2005) Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 3: e235.
82. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123: 631-40.
83. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209-16.
84. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208.
85. Okamura K, Liu N, Lai EC (2009) Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Mol Cell* 36: 431-44.
86. Zeng Y, Cullen BR (2003) Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* 9: 112-23.
87. Lai EC (2002) Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30: 363-4.
88. Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18: 504-11.
89. Wu L, Fan J, Belasco JG (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4034-9.
90. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835-40.
91. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, *et al.* (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37: 495-500.
92. He Y, Huang C, Lin X, Li J (2013) MicroRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases. *Biochimie* 95: 1355-9.
93. Wang L, Zhou L, Jiang P, Lu L, Chen X, Lan H, *et al.* (2012) Loss of miR-29 in myoblasts contributes to dystrophic muscle pathogenesis. *Mol Ther* 20: 1222-33.

94. Marco A, Macpherson JI, Ronshaugen M, Griffiths-Jones S (2012) MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. *Silence* 3: 8.
95. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E (2005) Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120: 21-4.
96. Barbato C, Arisi I, Frizzo ME, Brandi R, Da Sacco L, Masotti A (2009) Computational challenges in miRNA target predictions: to be or not to be a true target? *J Biomed Biotechnol* 2009: 803069.
97. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-98.
98. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 5: R1.
99. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *et al.* (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15524-9.
100. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, *et al.* (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2999-3004.
101. Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6: 857-66.
102. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, *et al.* (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353: 1793-801.
103. Slack FJ, Weidhaas JB (2008) MicroRNA in cancer prognosis. *N Engl J Med* 359: 2720-2.
104. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *et al.* (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-8.
105. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, *et al.* (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2257-61.
106. Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, Negrini M, Calin GA (2007) Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. *Expert Opin Biol Ther* 7: 1009-19.
107. Buscaglia LE, Li Y (2011) Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer* 30: 371-80.
108. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, *et al.* (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13944-9.
109. Di Leva G, Croce CM (2010) Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med* 16: 257-67.

110. Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, *et al.* (2004) Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 64: 3087-95.
111. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, *et al.* (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435: 828-33.
112. Aguda BD, Kim Y, Piper-Hunter MG, Friedman A, Marsh CB (2008) MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92, E2F, and Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19678-83.
113. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435: 839-43.
114. Rouhi A, Mager DL, Humphries RK, Kuchenbauer F (2008) MiRNAs, epigenetics, and cancer. *Mamm Genome* 19: 517-25.
115. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, *et al.* (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9: 435-43.
116. Fabbri M, Valeri N, Calin GA (2009) MicroRNAs and genomic variations: from Proteus tricks to Prometheus gift. *Carcinogenesis* 30: 912-7.
117. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H (2008) A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 29: 1963-6.
118. Ohtsuka M, Ling H, Doki Y, Mori M, Calin GA (2015) MicroRNA Processing and Human Cancer. *J Clin Med* 4: 1651-67.
119. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM (2006) Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20: 2202-7.
120. Walz AL, Ooms A, Gadd S, Gerhard DS, Smith MA, Guidry Auvil JM, *et al.* (2015) Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors. *Cancer Cell* 27: 286-97.
121. Wegert J, Ishaque N, Vardapour R, Georg C, Gu Z, Bieg M, *et al.* (2015) Mutations in the SIX1/2 pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA microprocessor complex underlie high-risk blastemal type Wilms tumors. *Cancer Cell* 27: 298-311.
122. Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, Gurnett CA, Dehner LP, Desruisseau D, *et al.* (2009) DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science* 325: 965.
123. Kliese N, Gobrecht P, Pachow D, Andrae N, Wilisch-Neumann A, Kirches E, *et al.* (2012) miRNA-145 is downregulated in atypical and anaplastic meningiomas and negatively regulates motility and proliferation of meningioma cells. *Oncogene*.
124. Saydam O, Shen Y, Wurdinger T, Senol O, Boke E, James MF, *et al.* (2009) Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 29: 5923-40.

125. Senol O, Schaaij-Visser TB, Erkan EP, Dorfer C, Lewandrowski G, Pham TV, *et al.* (2015) miR-200a-mediated suppression of non-muscle heavy chain IIb inhibits meningioma cell migration and tumor growth in vivo. *Oncogene* 34: 1790-8.
126. Zhi F, Zhou G, Wang S, Shi Y, Peng Y, Shao N, *et al.* (2013) A microRNA expression signature predicts meningioma recurrence. *Int J Cancer* 132: 128-36.
127. Wang M, Deng X, Ying Q, Jin T, Li M, Liang C (2015) MicroRNA-224 targets ERG2 and contributes to malignant progressions of meningioma. *Biochem Biophys Res Commun* 460: 354-61.
128. Galani V, Alexiou GA, Miliaras G, Dimitriadis E, Triantafyllou E, Galani A, *et al.* (2015) Expression of Stem Cell Marker Nestin and MicroRNA-21 in Meningiomas. *Turk Neurosurg* 25: 574-7.
129. Shi L, Jiang D, Sun G, Wan Y, Zhang S, Zeng Y, *et al.* (2012) miR-335 promotes cell proliferation by directly targeting Rb1 in meningiomas. *J Neurooncol* 110: 155-62.
130. Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G (2007) Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* 4: 76-84.
131. Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH, *et al.* (2016) miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res* 44: D239-47.
132. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20.
133. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
134. Puttmann S, Senner V, Braune S, Hillmann B, Exeler R, Rickert CH, *et al.* (2005) Establishment of a benign meningioma cell line by hTERT-mediated immortalization. *Lab Invest* 85: 1163-71.
135. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.
136. Shein HM, Enders JF, Levinthal JD (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 1350-7.
137. Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969) Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166: 747-9.
138. Henry CM, Hollville E, Martin SJ (2013) Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* 61: 90-7.
139. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
140. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.

141. Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406-12.
142. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, *et al.* (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7: 3.
143. Ludwig N, Kim YJ, Mueller SC, Backes C, Werner TV, Galata V, *et al.* (2015) Posttranscriptional deregulation of signaling pathways in meningioma subtypes by differential expression of miRNAs. *Neuro Oncol* 17: 1250-60.
144. Piechaczyk M, Blanchard JM (1994) c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol* 17: 93-131.
145. van Amerongen R, Berns A (2005) Re-evaluating the role of Frat in Wnt-signal transduction. *Cell Cycle* 4: 1065-72.
146. Turner N, Grose R (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 116-29.
147. Martin GS (2001) The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 467-75.
148. Brenner D, Mak TW (2009) Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21: 871-7.
149. Um HD (2016) Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget* 7: 5193-203.
150. Laddha SV, Nayak S, Paul D, Reddy R, Sharma C, Jha P, *et al.* (2013) Genome-wide analysis reveals downregulation of miR-379/miR-656 cluster in human cancers. *Biol Direct* 8: 10.
151. Haller F, von Heydebreck A, Zhang JD, Gunawan B, Langer C, Ramadori G, *et al.* (2010) Localization- and mutation-dependent microRNA (miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31. *J Pathol* 220: 71-86.
152. Gattolliat CH, Thomas L, Ciafre SA, Meurice G, Le Teuff G, Job B, *et al.* (2011) Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma. *Br J Cancer* 105: 1352-61.
153. Chen F, Hu SJ (2012) Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 26: 79-86.
154. Li L (2014) Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miR-34a in cancer. *J Cancer Res Ther* 10: 805-10.
155. Li XJ, Ren ZJ, Tang JH (2014) MicroRNA-34a: a potential therapeutic target in human cancer. *Cell Death Dis* 5: e1327.
156. Guennewig B, Roos M, Dogar AM, Gebert LF, Zagalak JA, Vongrad V, *et al.* (2014) Synthetic pre-microRNAs reveal dual-strand activity of miR-34a on TNF-alpha. *RNA* 20: 61-75.

157. Niederer F, Trenkmann M, Ospelt C, Karouzakis E, Neidhart M, Stanczyk J, *et al.* (2012) Down-regulation of microRNA-34a* in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis Rheum* 64: 1771-9.
158. Cha YH, Kim NH, Park C, Lee I, Kim HS, Yook JI (2012) MiRNA-34 intrinsically links p53 tumor suppressor and Wnt signaling. *Cell Cycle* 11: 1273-81.
159. Serna E, Morales JM, Mata M, Gonzalez-Darder J, San Miguel T, Gil-Benso R, *et al.* (2013) Gene expression profiles of metabolic aggressiveness and tumor recurrence in benign meningioma. *PLoS One* 8: e67291.
160. Sharma S, Ray S, Mukherjee S, Moiyadi A, Sridhar E, Srivastava S (2015) Multipronged quantitative proteomic analyses indicate modulation of various signal transduction pathways in human meningiomas. *Proteomics* 15: 394-407.
161. Kubiczko L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S (2012) TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* 10: 183.
162. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, *et al.* (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-3.
163. Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, *et al.* (1999) Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 18: 3098-103.
164. Nagatake M, Takagi Y, Osada H, Uchida K, Mitsudomi T, Saji S, *et al.* (1996) Somatic in vivo alterations of the DPC4 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res* 56: 2718-20.
165. MacGrogan D, Pegram M, Slamon D, Bookstein R (1997) Comparative mutational analysis of DPC4 (Smad4) in prostatic and colorectal carcinomas. *Oncogene* 15: 1111-4.
166. Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, Rimm DL, Camp RL, Haffty BG, *et al.* (2002) Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer Res* 62: 497-505.
167. Buschges R, Bostrom J, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, *et al.* (2001) Analysis of human meningiomas for aberrations of the MADH2, MADH4, APM-1 and DCC tumor suppressor genes on the long arm of chromosome 18. *Int J Cancer* 92: 551-4.
168. Elliott RL, Blobe GC (2005) Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 23: 2078-93.
169. Zaravinos A (2015) The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *J Oncol* 2015: 865816.
170. Gheldof A, Hulpiau P, van Roy F, De Craene B, Berx G (2012) Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 69: 2527-41.
171. Ye G, Fu G, Cui S, Zhao S, Bernaudo S, Bai Y, *et al.* (2011) MicroRNA 376c enhances ovarian cancer cell survival by targeting activin receptor-like kinase 7: implications for chemoresistance. *J Cell Sci* 124: 359-68.

172. Fu G, Ye G, Nadeem L, Ji L, Manchanda T, Wang Y, *et al.* (2013) MicroRNA-376c impairs transforming growth factor-beta and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion. *Hypertension* 61: 864-72.
173. Bai Y, Yang W, Yang HX, Liao Q, Ye G, Fu G, *et al.* (2012) Downregulated miR-195 detected in preeclamptic placenta affects trophoblast cell invasion via modulating ActRIIA expression. *PLoS One* 7: e38875.
174. Tang Y, Katuri V, Dillner A, Mishra B, Deng CX, Mishra L (2003) Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science* 299: 574-7.
175. Chen Y, Yu P, Lu D, Tagle DA, Cai T (2001) A novel isoform of beta-spectrin II localizes to cerebellar Purkinje-cell bodies and interacts with neurofibromatosis type 2 gene product schwannomin. *J Mol Neurosci* 17: 59-70.
176. Wu YY, Peck K, Chang YL, Pan SH, Cheng YF, Lin JC, *et al.* (2011) SCUBE3 is an endogenous TGF-beta receptor ligand and regulates the epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. *Oncogene* 30: 3682-93.
177. MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17: 9-26.
178. Guo G, Kuai D, Cai S, Xue N, Liu Y, Hao J, *et al.* (2013) Knockdown of FRAT1 expression by RNA interference inhibits human glioblastoma cell growth, migration and invasion. *PLoS One* 8: e61206.
179. Guo G, Liu B, Zhong C, Zhang X, Mao X, Wang P, *et al.* (2011) FRAT1 expression and its correlation with pathologic grade, proliferation, and apoptosis in human astrocytomas. *Med Oncol* 28: 1-6.
180. Guo G, Zhong CL, Liu Y, Mao XG, Zhang Z, Jin J, *et al.* (2015) Overexpression of FRAT1 is associated with malignant phenotype and poor prognosis in human gliomas. *Dis Markers* 2015: 289750.
181. Wang Y, Liu S, Zhu H, Zhang W, Zhang G, Zhou X, *et al.* (2008) FRAT1 overexpression leads to aberrant activation of beta-catenin/TCF pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 123: 561-8.
182. Yu Q, Shang LU, Yu H, Yang Z, Xu D (2016) Silencing of FRAT1 by siRNA inhibits the proliferation of SGC7901 human gastric adenocarcinoma cells. *Biomed Rep* 4: 223-226.
183. Zhang Y, Han Y, Zheng R, Yu JH, Miao Y, Wang L, *et al.* (2012) Expression of Frat1 correlates with expression of beta-catenin and is associated with a poor clinical outcome in human SCC and AC. *Tumour Biol* 33: 1437-44.
184. Zhang Y, Yu JH, Lin XY, Miao Y, Han Y, Fan CF, *et al.* (2011) Overexpression of Frat1 correlates with malignant phenotype and advanced stage in human non-small cell lung cancer. *Virchows Arch* 459: 255-63.
185. Shen L, Li J, Xu L, Ma J, Li H, Xiao X, *et al.* (2012) miR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w. *Exp Ther Med* 3: 475-480.

186. Yang X, Yin J, Yu J, Xiang Q, Liu Y, Tang S, *et al.* (2012) miRNA-195 sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to 5-FU by targeting BCL-w. *Oncol Rep* 27: 250-7.
187. Hui W, Yuntao L, Lun L, WenSheng L, ChaoFeng L, HaiYong H, *et al.* (2013) MicroRNA-195 inhibits the proliferation of human glioma cells by directly targeting cyclin D1 and cyclin E1. *PLoS One* 8: e54932.
188. Li D, Zhao Y, Liu C, Chen X, Qi Y, Jiang Y, *et al.* (2011) Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast cancer. *Clin Cancer Res* 17: 1722-30.
189. Wang R, Zhao N, Li S, Fang JH, Chen MX, Yang J, *et al.* (2013) MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2, and CDC42. *Hepatology* 58: 642-53.
190. Lee SH, Lee YS, Hong YG, Kang CS (2014) Significance of COX-2 and VEGF expression in histopathologic grading and invasiveness of meningiomas. *APMIS* 122: 16-24.
191. Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G, *et al.* (2005) Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer* 114: 249-56.
192. Hendrix ND, Wu R, Kuick R, Schwartz DR, Fearon ER, Cho KR (2006) Fibroblast growth factor 9 has oncogenic activity and is a downstream target of Wnt signaling in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 66: 1354-62.
193. Wang X, Gong Y, Wang D, Xie Q, Zheng M, Zhou Y, *et al.* (2012) Analysis of gene expression profiling in meningioma: deregulated signaling pathways associated with meningioma and EGFL6 overexpression in benign meningioma tissue and serum. *PLoS One* 7: e52707.
194. Teishima J, Yano S, Shoji K, Hayashi T, Goto K, Kitano H, *et al.* (2014) Accumulation of FGF9 in prostate cancer correlates with epithelial-to-mesenchymal transition and induction of VEGF-A expression. *Anticancer Res* 34: 695-700.
195. Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778: 660-9.
196. Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E (2006) Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* 49: 178-87.
197. Liu L, Chen L, Xu Y, Li R, Du X (2010) microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 400: 236-40.
198. Yang Y, Wu J, Guan H, Cai J, Fang L, Li J, *et al.* (2012) MiR-136 promotes apoptosis of glioma cells by targeting AEG-1 and Bcl-2. *FEBS Lett* 586: 3608-12.
199. Yin KJ, Deng Z, Huang H, Hamblin M, Xie C, Zhang J, *et al.* (2010) miR-497 regulates neuronal death in mouse brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 38: 17-26.

200. Silke J, Meier P (2013) Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
201. Abdelzaher E, El-Gendi SM, Yehya A, Gowil AG (2011) Recurrence of benign meningiomas: predictive value of proliferative index, BCL2, p53, hormonal receptors and HER2 expression. *Br J Neurosurg* 25: 707-13.
202. Domingues PH, Teodosio C, Otero A, Sousa P, Goncalves JM, Nieto AB, *et al.* (2015) The protein expression profile of meningioma cells is associated with distinct cytogenetic tumour subgroups. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41: 319-32.
203. Lee SH, Lee EH, Lee SH, Lee YM, Kim HD, Kim YZ (2015) Epigenetic Role of Histone 3 Lysine Methyltransferase and Demethylase in Regulating Apoptosis Predicting the Recurrence of Atypical Meningioma. *J Korean Med Sci* 30: 1157-66.
204. Kayaselcuk F, Zorludemir S, Bal N, Erdogan B, Erdogan S, Erman T (2004) The expression of survivin and Ki-67 in meningiomas: correlation with grade and clinical outcome. *J Neurooncol* 67: 209-14.
205. Konstantinidou AE, Givalos N, Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Kotsiakos X, Boviatsis E, *et al.* (2007) Caspase-3 immunohistochemical expression is a marker of apoptosis, increased grade and early recurrence in intracranial meningiomas. *Apoptosis* 12: 695-705.
206. Sabbatini M, Comi C, Chiocchetti A, Piffanelli V, Car PG, Dianzani U, *et al.* (2011) Signals of apoptotic pathways in several types of meningioma. *Pathol Oncol Res* 17: 51-9.
207. Wick W, Wagner S, Kerkau S, Dichgans J, Tonn JC, Weller M (1998) BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett* 440: 419-24.
208. Wick W, Wild-Bode C, Frank B, Weller M (2004) BCL-2-induced glioma cell invasiveness depends on furin-like proteases. *J Neurochem* 91: 1275-83.
209. Zuo J, Ishikawa T, Boutros S, Xiao Z, Humtsoe JO, Kramer RH (2010) Bcl-2 overexpression induces a partial epithelial to mesenchymal transition and promotes squamous carcinoma cell invasion and metastasis. *Mol Cancer Res* 8: 170-82.
210. Noujaim D, van Golen CM, van Golen KL, Grauman A, Feldman EL (2002) N-Myc and Bcl-2 coexpression induces MMP-2 secretion and activation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 21: 4549-57.
211. Choi J, Choi K, Benveniste EN, Rho SB, Hong YS, Lee JH, *et al.* (2005) Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res* 65: 5554-60.
212. Koehler BC, Scherr AL, Lorenz S, Urbanik T, Kautz N, Elssner C, *et al.* (2013) Beyond cell death - antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *PLoS One* 8: e76446.
213. Harris SL, Levine AJ (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24: 2899-908.
214. Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Arai S, Shimamura T, *et al.* (2013) The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 8: e60155.

215. Xu T, Zhu Y, Xiong Y, Ge YY, Yun JP, Zhuang SM (2009) MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 50: 113-21.
216. Kim MS, Kim KH, Lee EH, Lee YM, Lee SH, Kim HD, *et al.* (2014) Results of immunohistochemical staining for cell cycle regulators predict the recurrence of atypical meningiomas. *J Neurosurg* 121: 1189-200.
217. Wisdom R, Johnson RS, Moore C (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J* 18: 188-97.
218. Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Mohle-Steinlein U, Tian J, *et al.* (1999) Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* 13: 607-19.
219. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, *et al.* (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447: 1130-4.
220. Hilton DA, Shivane A, Kirk L, Bassiri K, Enki DG, Hanemann CO (2016) Activation of multiple growth factor signalling pathways is frequent in meningiomas. *Neuropathology* 36: 250-61.
221. Luo M, Shen D, Zhou X, Chen X, Wang W (2013) MicroRNA-497 is a potential prognostic marker in human cervical cancer and functions as a tumor suppressor by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *Surgery* 153: 836-47.
222. Zehavi L, Avraham R, Barzilai A, Bar-Ilan D, Navon R, Sidi Y, *et al.* (2012) Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor. *Mol Cancer* 11: 44.
223. Lallemand D, Manent J, Couvelard A, Watilliaux A, Siena M, Chareyre F, *et al.* (2009) Merlin regulates transmembrane receptor accumulation and signaling at the plasma membrane in primary mouse Schwann cells and in human schwannomas. *Oncogene* 28: 854-65.
224. Zhao WY, Wang Y, An ZJ, Shi CG, Zhu GA, Wang B, *et al.* (2013) Downregulation of miR-497 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting HDGF in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 435: 466-71.
225. Guo Z, He Y, Wang S, Zhang A, Zhao P, Gao C, *et al.* (2011) Various effects of hepatoma-derived growth factor on cell growth, migration and invasion of breast cancer and prostate cancer cells. *Oncol Rep* 26: 511-7.
226. Lian J, Tang J, Shi H, Li H, Zhen T, Xie W, *et al.* (2015) Positive feedback loop of hepatoma-derived growth factor and beta-catenin promotes carcinogenesis of colorectal cancer. *Oncotarget* 6: 29357-74.
227. Iwaki J, Kikuchi K, Mizuguchi Y, Kawahigashi Y, Yoshida H, Uchida E, *et al.* (2013) MiR-376c down-regulation accelerates EGF-dependent migration by targeting GRB2 in the HuCCT1 human intrahepatic cholangiocarcinoma cell line. *PLoS One* 8: e69496.
228. Jin Y, Peng D, Shen Y, Xu M, Liang Y, Xiao B, *et al.* (2013) MicroRNA-376c inhibits cell proliferation and invasion in osteosarcoma by targeting to transforming growth factor-alpha. *DNA Cell Biol* 32: 302-9.

229. Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET (1998) MIB-1 (Ki-67) index and transforming growth factor-alpha (TGF alpha) immunoreactivity are significant prognostic predictors for meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 441-52.
230. Wang X, Lu X, Zhang T, Wen C, Shi M, Tang X, *et al.* (2016) mir-329 restricts tumor growth by targeting grb2 in pancreatic cancer. *Oncotarget*.
231. Wu H, Liu Y, Shu XO, Cai Q (2016) MiR-374a suppresses lung adenocarcinoma cell proliferation and invasion by targeting TGFA gene expression. *Carcinogenesis* 37: 567-75.
232. Preusser M, Hassler M, Birner P, Rudas M, Acker T, Plate KH, *et al.* (2012) Microvascularization and expression of VEGF and its receptors in recurring meningiomas: pathobiological data in favor of anti-angiogenic therapy approaches. *Clin Neuropathol* 31: 352-60.
233. Otsuka S, Tamiya T, Ono Y, Michiue H, Kurozumi K, Daido S, *et al.* (2004) The relationship between peritumoral brain edema and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in intracranial meningiomas. *J Neurooncol* 70: 349-57.
234. Tsai JC, Hsiao YY, Teng LJ, Shun CT, Chen CT, Goldman CK, *et al.* (1999) Regulation of vascular endothelial growth factor secretion in human meningioma cells. *J Formos Med Assoc* 98: 111-7.
235. Jensen RL, Soleau S, Bhayani MK, Christiansen D (2002) Expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and correlation with preoperative embolization of meningiomas. *J Neurosurg* 97: 658-67.
236. Wu Y, Lucia K, Lange M, Kuhlen D, Stalla GK, Renner U (2014) Hypoxia inducible factor-1 is involved in growth factor, glucocorticoid and hypoxia mediated regulation of vascular endothelial growth factor-A in human meningiomas. *J Neurooncol* 119: 263-73.
237. Monleon D, Morales JM, Gonzalez-Segura A, Gonzalez-Darder JM, Gil-Benso R, Cerda-Nicolas M, *et al.* (2010) Metabolic aggressiveness in benign meningiomas with chromosomal instabilities. *Cancer Res* 70: 8426-34.
238. Mao JH, Zhou RP, Peng AF, Liu ZL, Huang SH, Long XH, *et al.* (2012) microRNA-195 suppresses osteosarcoma cell invasion and migration in vitro by targeting FASN. *Oncol Lett* 4: 1125-1129.
239. Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M (2010) Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol* 6: 551-62.
240. Haase D, Schmidl S, Ewald C, Kalff R, Huebner C, Firsching R, *et al.* (2010) Fatty acid synthase as a novel target for meningioma therapy. *Neuro Oncol* 12: 844-54.
241. Jiang J, Lin C, Liu N, Zhang Z, Sun Y, Fang X, *et al.* (2013) The expression of fatty acid metabolism-associated proteins is correlated with the prognosis of meningiomas. *APMIS* 121: 997-1003.
242. Noma T, Fujisawa K, Yamashiro Y, Shinohara M, Nakazawa A, Gondo T, *et al.* (2001) Structure and expression of human mitochondrial adenylate kinase targeted to the mitochondrial matrix. *Biochem J* 358: 225-32.

243. Admoni-Elisha L, Nakdimon I, Shteinfefer A, Prezma T, Arif T, Arbel N, *et al.* (2016) Novel Biomarker Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia: Impact on Diagnosis, Prognosis and Treatment. PLoS One 11: e0148500.
244. Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S, *et al.* (2010) Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. PLoS One 5: e9644.
245. Liu C, Teng ZQ, McQuate AL, Jobe EM, Christ CC, von Hoyningen-Huene SJ, *et al.* (2013) An epigenetic feedback regulatory loop involving microRNA-195 and MBD1 governs neural stem cell differentiation. PLoS One 8: e51436.
246. Liu C, Teng ZQ, Santistevan NJ, Szulwach KE, Guo W, Jin P, *et al.* (2010) Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. Cell Stem Cell 6: 433-44.
247. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W (2007) Tissue-dependent paired expression of miRNAs. Nucleic Acids Res 35: 5944-53.
248. Ge Y, Zhang L, Nikolova M, Reva B, Fuchs E (2016) Strand-specific in vivo screen of cancer-associated miRNAs unveils a role for miR-21(*) in SCC progression. Nat Cell Biol 18: 111-21.
249. Rhodes LV, Martin EC, Segar HC, Miller DF, Buechlein A, Rusch DB, *et al.* (2015) Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer. Oncotarget 6: 16638-52.
250. Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, *et al.* (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. RNA 17: 312-26.
251. Qiao P, Li G, Bi W, Yang L, Yao L, Wu D (2015) microRNA-34a inhibits epithelial mesenchymal transition in human cholangiocarcinoma by targeting Smad4 through transforming growth factor-beta/Smad pathway. BMC Cancer 15: 469.
252. Yang F, Li QJ, Gong ZB, Zhou L, You N, Wang S, *et al.* (2014) MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment. Technol Cancer Res Treat 13: 77-86.

7. Anhang

Übersicht der Patientenkollektive

Tabelle A1: Detaillierte Übersicht des ersten Patientenkollektivs (Set 1) bestehend aus 55 Meningeompatienten. Angegeben sind Geschlecht und Alter des Patienten, der Ki-67-Proliferationsindex des Tumors sowie der RIN-Wert der isolierten RNA. N/A bedeutet, dass der Wert nicht ermittelt werden konnte.

ID	Alter	Geschlecht	WHO Grad	Histologischer Subtyp	Ki-67 Proliferationsindex	RNA Qualität (RIN)
H90	68	f	I	Fibroblastisch	5	8,2
H429	64	f	I	Fibroblastisch	8	8,3
H444	56	f	I	Fibroblastisch	3	N/A
H659	38	m	I	Fibroblastisch	7	N/A
H691	71	f	I	Fibroblastisch	7	8,6
H695	47	f	I	Fibroblastisch	5	8,1
H987	48	f	I	Fibroblastisch	1	8,7
H989	46	f	I	Fibroblastisch	4	8,3
H1116	75	f	I	Fibroblastisch	N/A	8,8
H2347	53	m	I	Fibroblastisch	8	8,6
H480	73	f	I	Meningothelial	2	8,6
H800	72	m	I	Meningothelial	3	7,3
H975	47	f	I	Meningothelial	<1	N/A
H2313	63	f	I	Meningothelial	2	N/A
H2358	64	f	I	Meningothelial	4	N/A
H2382	79	m	I	Meningothelial	1	N/A
H2401	58	f	I	Meningothelial	3	8,7
H2416	77	m	I	Meningothelial	1	7,1
H2419	75	m	I	Meningothelial	2	8,5
H2441	66	m	I	Meningothelial	5	8,4
H2460	73	f	I	Meningothelial	2	8,1
H2463	63	m	I	Meningothelial	1	8
H294	45	f	I	Transitional	N/A	8,3
H302	64	f	I	Transitional	N/A	8,3
H340	33	f	I	Transitional	3	8,4
H442	38	f	I	Transitional	3	7,5
H470	62	f	I	Transitional	7	N/A
H597	47	f	I	Transitional	6	N/A
H693	85	f	I	Transitional	6	8,3
H833	60	f	I	Transitional	N/A	7,3
H841	63	f	I	Transitional	<1	7,8
H857	67	m	I	Transitional	N/A	7,7
H2314	73	f	I	Transitional	2	7,9

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	WHO Grad	Histologischer Subtyp	Ki-67 Proliferationsindex	RNA Qualität (RIN)
H149	56	m	II	Atypisch	8	8,6
H249	52	f	II	Atypisch	6	8,5
H2280	67	f	II	Atypisch	12	7,5
H2287	86	f	II	Atypisch	9	N/A
H2343	59	f	II	Atypisch	10	8,5
H2374	23	f	II	Atypisch	15	7,9
H2385	87	f	II	Atypisch	12	5,8
H2395	51	m	II	Atypisch	20	8,1
H2399	68	f	II	Atypisch	10	8,6
H2400	13	m	II	Atypisch	20	8,3
H12	68	m	III	Anaplastisch	N/A	8,7
H83	38	m	III	Anaplastisch	15	9
H108	60	f	III	Anaplastisch	5	8,4
H288	38	m	III	Anaplastisch	17	6,6
H311	62	m	III	Anaplastisch	7	7,7
H450	66	f	III	Anaplastisch	9	8,1
H588	58	m	III	Anaplastisch	25	5,5
H1021	46	m	III	Anaplastisch	25	8,5
H1044	64	f	III	Anaplastisch	17	8,4
H1179	32	f	III	Anaplastisch	17	8
H1904	89	m	III	Anaplastisch	19	8,6
H1915	53	m	III	Anaplastisch	20	9,2

Tabelle A2: Detaillierte Übersicht des unabhängigen Patientenkollektivs (Set 2) bestehend aus 95 Meningeompatienten. Angegeben sind Geschlecht und Alter des Patienten, der Ki-67-Proliferationsindex des Tumors sowie der RIN-Wert der isolierten RNA. N/A bedeutet, dass der Wert nicht ermittelt werden konnte.

ID	Alter	Geschlecht	WHO Grad	Histologischer Subtyp	Ki-67 Proliferationsindex	RNA Qualität (RIN)
H2442	62	m	I	Angiomatös	4	8,7
H2415	66	f	I	Fibroblastisch	2	N/A
H2443	47	f	I	Fibroblastisch	8	8,5
H2503	33	f	I	Fibroblastisch	5	8,6
H2558	51	f	I	Fibroblastisch	2	8,4
H2608	63	f	I	Fibroblastisch	2	9,3
H2619	50	f	I	Fibroblastisch	1	9,5
H2364	56	m	I	Meningothelial	2	9,3
H2365	59	f	I	Meningothelial	<1	2,6
H2383	50	m	I	Meningothelial	5	8,7
H2430	81	f	I	Meningothelial	2	8,4
H2431	47	f	I	Meningothelial	<5	8,1
H2464	71	m	I	Meningothelial	3	8,8
H2466	73	f	I	Meningothelial	3	8,7
H2497	75	m	I	Meningothelial	N/A	9,6
H2498	82	f	I	Meningothelial	3	8,1
H2505	48	f	I	Meningothelial	2	8,6
H2530	66	m	I	Meningothelial	6	9,2
H2531	49	f	I	Meningothelial	8	9
H2533	52	f	I	Meningothelial	<1	7,4
H2539	59	f	I	Meningothelial	1	8,8
H2542	52	f	I	Meningothelial	5	8,5
H2546	70	f	I	Meningothelial	1	8,4
H2550	51	f	I	Meningothelial	<1	9,2
H2571	74	m	I	Meningothelial	2	7,9
H2572	78	f	I	Meningothelial	3	9
H2577	76	f	I	Meningothelial	3	9,2
H2578	60	m	I	Meningothelial	3	8,8
H2598	85	f	I	Meningothelial	3	8,5
H2599	58	f	I	Meningothelial	1	7,4
H2603	71	f	I	Meningothelial	3	7,8
H2605	80	m	I	Meningothelial	2	7
H2610	67	f	I	Meningothelial	4	9
H2628	80	m	I	Meningothelial	5	9,1
H2630	44	f	I	Meningothelial	2	8,7
H2631	69	f	I	Meningothelial	5	8,7
H2639	55	f	I	Meningothelial	1	9,1
H2644	48	f	I	Meningothelial	2	9,1
H2657	40	f	I	Meningothelial	8	1,1
H2668	72	f	I	Meningothelial	<1	8,1

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	WHO Grad	Histologischer Subtyp	Ki-67 Proliferationsindex	RNA Qualität (RIN)
H2669	72	f	I	Meningothelial	5	5,9
H2672	84	f	I	Meningothelial	2	8,1
H2675	52	f	I	Meningothelial	2	8,6
H2677	67	m	I	Meningothelial	5	8,9
H2368	63	m	I	Mikrozystisch	<1	8,1
H2537	49	m	I	Mikrozystisch	<1	4,6
H2540	47	f	I	Mikrozystisch	3	8,7
H2584	83	f	I	Mikrozystisch	1	8
H2648	71	m	I	Mikrozystisch	4	1,7
H2662	48	m	I	Mikrozystisch	5	N/A
H2386	77	f	I	Psammomatös	3	8,4
H2525	70	f	I	Psammomatös	2	8
H2523	60	f	I	Sekretorisch	<1	8,5
H2437	62	f	I	Transitional	1	9,1
H2549	47	f	I	Transitional	5	9,5
H2563	56	f	I	Transitional	N/A	9,5
H2564	73	f	I	Transitional	N/A	9,1
H2591	59	f	I	Transitional	1	8,8
H2593	42	f	I	Transitional	<1	8,3
H2595	59	f	I	Transitional	3	8,5
H2361	71	f	II	Atypisch	15	8,4
H2371	39	f	II	Atypisch	15	8,8
H2423	80	f	II	Atypisch	10	8,5
H2427	47	m	II	Atypisch	5	8,7
H2451	49	f	II	Atypisch	5	7,9
H2469	82	m	II	Atypisch	15	6,4
H2481	70	f	II	Atypisch	15	8,1
H2491	86	f	II	Atypisch	10	6,8
H2492	68	m	II	Atypisch	15	2,6
H2502	72	f	II	Atypisch	20	8,2
H2504	30	f	II	Atypisch	20	8,3
H2518	65	m	II	Atypisch	15	8,4
H2521	74	m	II	Atypisch	15	9,1
H2555	50	m	II	Atypisch	15	9
H2561	71	m	II	Atypisch	12	5,1
H2570	66	m	II	Atypisch	12	9
H2587	79	m	II	Atypisch	8	9,3
H2600	78	f	II	Atypisch	15	8,4
H2614	55	f	II	Atypisch	15	5,7
H2618	74	m	II	Atypisch	10	9,2
H2642	68	m	II	Atypisch	N/A	9,1
H2645	28	m	II	Atypisch	10	8,4
H2655	32	m	II	Atypisch	5	9,1

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	WHO Grad	Histologischer Subtyp	Ki-67 Proliferationsindex	RNA Qualität (RIN)
H2408	52	m	II	Chordoid	20	8,1
H2609	73	m	II	Chordoid	6	8,2
H2378	70	m	II	Hirninvasiv	3	7,8
H2426	70	f	II	Hirninvasiv	10	8,1
H2512	70	m	II	Hirninvasiv	3	2,5
H2410	75	m	III	Anaplastisch	30	9,1
H2547	60	f	III	Anaplastisch	20	4
H2553	88	f	III	Anaplastisch	20	6,9
H2581	88	m	III	Anaplastisch	20	9
H2594	74	m	III	Anaplastisch	50	8,2
H2650	75	f	III	Anaplastisch	50	7,1
24661	83	f	III	Anaplastisch	20	9,3

ΔCq Rohwerte

Tabelle A3: RT-qPCR Ergebnisse für das erste Patientenkollektiv (Set 1). Es sind die ΔCq Rohwerte für die jeweilige miRNA bezogen zur endogenen Kontrolle RNU6B angegeben. N/A bedeutet, dass keine Amplifikation eines Produkts in der RT-qPCR gemessen wurde. “-“ bedeutet, dass die miRNA in dieser Probe nicht getestet wurde. WHO Grad und histologischer Subtyp der Tumoren können der Tabelle A1 entnommen werden.

ID	ΔCq Rohwerte											
	hsa-miR-222	hsa-miR-195	hsa-miR-497	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-136	hsa-miR-376c	hsa-miR-181a	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-21	hsa-miR-218	hsa-miR-101	hsa-miR-379
H90	6,07	3,35	7,29	9,68	7,47	6,09	3,86	4,12	2,21	6,77	3,25	8,36
H429	3,97	1,61	5,73	9,53	8,53	5,88	3,72	3,82	3,25	6,71	4,11	7,71
H444	4,16	1,84	4,86	8,98	8,17	6,16	4,12	3,27	2,52	7,12	2,82	8,76
H659	6,93	3,96	8,74	10,12	9,79	8,86	4,32	5,41	3,16	7,45	4,13	11,51
H691	4,29	4,01	4,76	7,46	7,07	4,70	4,39	4,87	2,87	7,59	-2,81	2,92
H695	4,18	3,21	5,53	10,12	9,71	6,32	4,53	4,72	2,33	7,07	4,33	10,00
H987	4,32	3,03	5,88	9,86	8,40	6,17	4,81	4,28	3,72	6,96	3,74	8,48
H989	4,29	2,16	5,75	9,29	8,78	5,61	4,46	3,61	3,56	6,97	3,37	8,86
H1116	5,00	3,64	5,35	8,11	6,84	5,02	4,93	3,96	3,71	8,37	2,87	8,45
H2347	5,28	2,53	5,50	9,54	8,52	5,64	5,15	4,09	2,85	7,81	3,48	3,60
H480	5,88	6,46	8,64	10,54	8,29	6,07	6,41	5,81	3,86	8,29	3,97	8,46
H800	6,03	5,25	7,98	8,77	12,47	9,86	1,62	4,15	0,20	7,44	3,66	12,31
H975	8,49	6,08	7,57	9,10	7,00	5,38	3,94	9,86	5,09	5,98	3,14	7,67
H2313	6,94	3,21	8,07	11,07	8,20	6,94	2,80	3,23	2,95	6,04	3,22	9,15
H2358	7,84	5,08	8,76	10,28	8,67	7,09	3,80	5,13	3,70	5,82	3,18	11,59
H2382	8,48	6,13	8,14	11,10	9,40	8,23	4,01	10,01	4,18	9,46	5,00	10,36
H2401	7,41	3,74	6,32	9,24	6,53	5,20	3,80	8,74	4,46	7,39	2,97	7,88
H2416	-	3,31	7,89	-	-	-	3,98	4,99	4,22	6,83	-	-
H2419	5,98	3,88	7,07	11,20	9,31	7,92	3,14	5,46	3,59	6,41	5,23	8,14
H2441	7,63	5,30	6,97	10,59	9,25	5,99	5,24	8,86	5,46	9,09	5,38	2,93
H2460	7,66	3,52	7,34	10,42	10,48	8,78	2,30	3,20	3,22	4,10	2,97	10,42
H2463	7,35	3,98	9,25	10,83	9,55	6,78	2,58	3,13	2,76	5,22	2,51	8,98
H294	7,48	5,04	8,79	10,39	9,93	6,97	2,78	4,78	3,86	5,87	4,39	3,78
H302	6,00	2,24	6,30	9,37	7,54	4,88	4,83	4,20	2,18	7,19	3,53	8,35
H340	5,37	2,57	6,39	9,54	9,53	6,25	4,98	4,55	3,84	7,50	3,93	9,89
H442	6,82	4,71	6,56	11,29	7,63	6,20	5,25	6,64	3,17	7,88	6,67	6,59
H470	6,34	3,40	6,22	9,66	9,63	5,91	4,23	5,10	2,89	7,01	4,63	9,65
H597	3,86	2,09	5,30	8,74	7,26	5,67	4,38	5,01	3,82	7,39	3,46	8,43
H693	4,48	3,99	6,24	8,94	9,16	6,40	3,95	6,14	3,33	9,27	3,76	9,28
H833	3,08	1,94	4,80	8,49	8,46	6,37	4,49	6,12	0,45	7,15	-2,60	3,50
H841	4,66	3,01	4,98	8,86	8,10	5,85	4,47	4,39	2,63	7,09	2,81	9,41
H857	4,26	3,89	5,01	8,61	8,24	5,82	5,41	5,47	3,66	8,88	-1,75	3,99
H2314	4,82	3,74	3,99	7,98	7,41	5,13	5,29	4,60	3,82	8,71	-1,05	2,75

ID	ΔCq Rohwerte											
	hsa-miR-222	hsa-miR-195	hsa-miR-497	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-136	hsa-miR-376c	hsa-miR-181a	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-21	hsa-miR-218	hsa-miR-101	hsa-miR-379
H149	7,75	6,73	9,39	9,62	10,20	6,82	4,02	7,80	3,16	8,45	4,27	8,95
H249	7,32	5,04	9,42	10,64	8,12	4,93	4,60	5,12	2,50	6,38	4,32	8,43
H2280	5,11	7,40	9,98	11,34	10,49	7,69	4,99	7,78	4,78	11,61	5,65	9,57
H2287	4,81	3,33	6,23	8,68	8,22	5,79	5,39	6,22	4,50	7,46	3,51	9,43
H2343	2,89	1,93	5,35	10,54	9,09	6,15	4,22	2,86	2,91	6,95	4,32	3,55
H2374	5,86	2,18	7,62	10,86	8,47	6,46	2,41	3,83	2,37	4,65	4,04	9,58
H2385	6,18	4,80	5,43	11,93	18,32	16,27	3,71	6,11	3,58	8,40	5,58	N/A
H2395	4,86	2,08	5,91	9,32	7,74	5,98	4,61	3,35	1,84	5,85	3,14	8,41
H2399	7,28	7,02	8,51	9,16	17,91	15,66	4,49	8,75	5,20	10,27	3,88	N/A
H2400	5,96	6,28	7,05	11,69	10,93	8,40	2,60	6,84	4,18	9,71	6,11	10,20
H12	5,40	4,86	9,06	11,97	14,03	11,86	3,39	5,18	4,07	7,66	5,88	7,78
H83	7,88	4,22	9,98	11,66	15,45	13,90	2,22	4,63	2,29	9,01	4,64	N/A
H108	4,87	4,23	7,48	11,70	14,99	14,04	3,44	4,01	2,67	7,46	5,21	N/A
H288	5,57	2,59	5,50	9,98	6,13	5,34	4,16	5,16	-0,13	11,03	5,04	7,11
H311	6,72	4,13	8,89	12,21	15,98	13,26	2,40	4,64	1,30	6,03	6,35	15,71
H450	5,29	8,60	10,00	13,23	11,80	8,85	6,60	13,41	5,65	10,09	6,78	5,89
H588	5,94	4,45	7,47	11,53	15,62	13,24	2,96	4,56	0,12	11,92	4,93	N/A
H1021	6,10	6,40	8,28	12,13	13,02	11,22	5,01	10,76	4,96	9,62	5,36	13,56
H1044	8,28	6,89	12,30	10,95	9,37	7,01	2,85	6,16	3,12	10,99	4,91	8,56
H1179	3,68	8,15	9,37	11,62	10,52	7,42	5,93	10,43	5,35	13,70	5,71	10,92
H1904	7,05	5,70	7,12	10,99	6,89	4,01	3,26	4,33	0,07	13,09	4,57	6,36
H1915	7,61	8,47	12,49	11,93	12,32	9,53	5,37	12,60	4,70	11,71	0,05	6,75

Tabelle A4: RT-qPCR Ergebnisse für das unabhängige Patientenkollektiv (Set 2). Es sind die ΔCq Rohwerte für die jeweilige miRNA bezogen zur endogenen Kontrolle RNU6B angegeben. N/A bedeutet, dass keine Amplifikation eines Produkts in der RT-qPCR gemessen wurde. “-“ bedeutet, dass die miRNA in dieser Probe nicht getestet wurde. WHO Grad und histologischer Subtyp der Tumoren können der Tabelle A2 entnommen werden.

ID	ΔCq Rohwerte					
	hsa-miR-222	hsa-miR-195	hsa-miR-497	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-136	hsa-miR-376c
H2442	5,92	0,37	4,41	9,79	8,67	6,53
H2415	6,67	1,44	2,68	9,76	8,00	7,14
H2443	5,99	0,44	1,92	8,20	7,24	4,99
H2503	6,17	1,06	2,61	8,12	7,00	5,84
H2558	6,16	-0,07	1,51	7,06	6,29	4,74
H2608	5,77	1,13	2,92	8,05	6,94	5,92
H2619	5,80	1,15	3,78	9,10	9,67	6,21
H2364	7,67	3,32	6,73	9,61	10,53	8,54
H2365	3,16	0,36	2,60	7,89	7,47	6,35
H2383	7,61	1,42	3,28	10,51	7,78	6,68
H2430	1,77	0,34	5,31	10,60	7,69	6,09
H2431	4,02	0,54	6,03	11,94	7,47	7,84
H2464	6,44	1,26	5,47	10,67	9,97	7,92
H2466	6,77	0,82	4,59	10,23	11,19	8,59
H2497	7,26	2,26	7,06	9,90	7,53	6,00
H2498	5,67	0,32	2,50	9,47	7,80	5,54
H2505	7,39	-1,82	6,01	9,88	7,12	5,97
H2530	7,16	1,16	3,28	8,19	7,59	6,06
H2531	6,14	1,21	2,83	9,29	7,16	5,81
H2533	4,98	0,50	4,01	9,30	7,99	6,31
H2539	8,57	1,73	5,44	11,02	9,80	8,12
H2542	6,26	1,21	4,10	8,74	9,33	7,12
H2546	6,74	2,01	4,62	9,07	7,43	6,10
H2550	7,44	2,06	4,50	8,21	8,44	7,29
H2571	7,51	2,63	5,67	9,51	8,92	7,57
H2572	5,34	1,24	3,44	8,10	6,49	5,47
H2577	7,69	1,03	3,56	9,91	11,46	9,79
H2578	6,86	1,36	4,64	8,99	8,16	6,46
H2598	6,60	2,72	6,12	8,12	7,62	6,11
H2599	6,62	1,13	4,38	9,71	8,52	6,67
H2603	6,83	0,43	4,80	9,47	9,07	7,49
H2605	7,00	1,10	3,71	7,88	11,83	9,82
H2610	7,47	2,47	4,60	7,91	7,87	6,84
H2628	7,84	3,22	6,85	10,59	14,58	12,90
H2630	4,30	0,79	3,21	8,20	7,41	5,47
H2631	5,77	2,19	7,02	9,17	7,97	6,40
H2639	4,78	0,41	1,81	7,00	6,15	4,57
H2644	3,86	0,45	3,61	7,65	8,54	6,27

ID	ΔCq Rohwerte					
	hsa-miR-222	hsa-miR-195	hsa-miR-497	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-136	hsa-miR-376c
H2657	6,76	0,44	5,62	10,08	9,56	7,29
H2668	3,44	-0,88	5,10	10,06	10,78	11,11
H2669	4,74	0,08	2,33	7,22	8,01	5,14
H2672	6,05	1,06	5,01	9,09	8,34	6,56
H2675	6,66	2,19	6,44	10,45	8,47	6,84
H2677	6,44	2,38	6,71	8,00	8,46	7,86
H2368	5,66	3,45	7,74	8,86	10,49	8,62
H2537	5,54	0,75	3,77	8,46	9,26	6,75
H2540	8,71	2,59	7,76	8,96	7,94	4,96
H2584	4,46	1,48	6,90	12,98	11,40	9,79
H2648	5,65	-0,37	3,31	7,76	10,27	6,35
H2662	5,91	0,38	2,83	8,94	8,91	6,34
H2386	4,67	0,88	3,94	8,11	6,95	6,35
H2525	4,75	0,84	2,02	7,76	8,20	6,58
H2523	5,50	-2,34	4,99	8,32	9,47	6,98
H2437	3,05	-0,08	2,42	8,27	7,81	5,77
H2549	6,06	2,29	5,93	9,62	8,00	6,40
H2563	7,88	2,63	7,62	9,43	7,72	6,77
H2564	5,42	1,22	3,33	8,44	8,60	6,23
H2591	7,39	1,58	4,92	8,48	9,33	5,96
H2593	5,37	1,09	2,54	7,22	5,64	6,36
H2595	5,25	0,91	3,27	8,92	8,87	4,25
H2361	3,11	2,49	9,60	14,80	11,72	9,37
H2371	8,10	5,61	10,36	11,24	9,83	9,04
H2423	5,74	0,34	2,28	8,93	7,27	5,85
H2427	6,87	1,85	7,23	10,34	13,53	11,87
H2451	6,36	1,35	4,43	11,27	10,38	7,25
H2469	5,65	1,28	3,05	8,17	8,00	5,84
H2481	7,44	4,04	9,49	10,49	11,66	9,87
H2491	7,32	2,35	5,09	11,72	12,65	10,44
H2492	5,59	1,85	6,19	12,07	7,85	6,85
H2502	7,06	1,87	4,80	9,46	13,83	11,88
H2504	8,15	-1,61	3,47	10,06	9,56	8,10
H2518	5,93	-2,33	4,01	9,50	7,40	6,95
H2521	4,59	-1,28	6,35	9,99	13,48	13,06
H2555	6,11	0,96	2,66	8,16	6,97	5,40
H2561	8,64	1,88	3,74	8,78	14,23	13,86
H2570	5,59	1,12	2,92	8,11	6,28	4,95
H2587	4,42	0,85	2,57	8,16	6,76	3,87
H2600	6,42	2,09	5,26	9,99	12,08	10,17
H2614	7,22	3,98	8,75	10,77	12,73	11,60
H2618	7,94	3,22	6,06	9,11	15,23	13,59

ID	ΔCq Rohwerte					
	hsa-miR-222	hsa-miR-195	hsa-miR-497	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-136	hsa-miR-376c
H2642	5,56	2,81	6,04	11,11	8,35	6,98
H2645	7,46	2,99	7,02	9,77	13,95	12,22
H2655	7,28	2,33	5,47	9,92	8,20	6,22
H2408	5,65	2,47	8,80	13,03	11,20	11,94
H2609	8,14	1,92	4,70	10,58	11,41	9,21
H2378	3,92	2,31	4,30	8,22	8,24	7,09
H2426	4,17	0,57	5,45	11,35	10,81	8,41
H2512	5,30	-2,68	3,08	8,55	8,07	6,89
H2410	7,60	2,09	4,78	10,44	8,97	9,13
H2547	6,17	2,40	5,09	9,73	7,34	6,47
H2553	4,85	2,80	6,50	10,54	14,80	13,94
H2581	4,90	2,83	7,25	10,79	15,30	13,86
H2594	5,03	2,00	4,46	9,95	7,53	4,25
H2650	7,74	2,28	5,24	10,09	14,38	13,65
24661	2,31	1,86	5,01	10,74	14,80	12,50

8. Publikationen

Publikationen

Folgende Veröffentlichungen sind im Laufe meiner Promotion am Institut für Humangenetik bei Prof. Dr. Eckart Meese entstanden:

1. Harz C, Ludwig N, Lang S, Werner TV, Galata V, Backes C, Schmitt K, Nickels R, Krause E, Jung M, Rettig J, Keller A, Menger M, Zimmermann R, Meese E (2014) **Secretion and immunogenicity of the meningioma-associated antigen TXNDC16**. J Immunol 193: 3146-54.
2. Ludwig N, Kim YJ, Mueller SC, Backes C, Werner TV, Galata V, Sartorius E, Bohle RM, Keller A, Meese E (2015) **Posttranscriptional deregulation of signaling pathways in meningioma subtypes by differential expression of miRNAs**. Neuro Oncol 17: 1250-60.
3. Ludwig N, Werner TV, Backes C, Trampert P, Gessler M, Keller A, Lenhof HP, Graf N, Meese E (2016) **Combining miRNA and mRNA Expression Profiles in Wilms Tumor Subtypes**. Int J Mol Sci 17.
4. Werner TV, Hart M, Nickels R, Kim YJ, Menger MD, Bohle RM, Keller A, Ludwig N*, Meese E* (2016) **MiR-34a-3p directly targets SMAD4, FRAT1 and BCL2 and alters proliferation and apoptosis of meningioma cells *in vitro***.
Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht, in Revision

* gleichberechtigte Letztautoren

Poster

- 09/2016 Joint-Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy (DGNN) and the Scandinavian Neuropathology Society (SNS), Hamburg
- MiR-34a-3p directly targets SMAD4, FRAT1 and BCL2 and alters proliferation and apoptosis of meningioma cells *in vitro***
Werner TV, Hart M, Nickels R, Kim YJ, Menger MD, Bohle RM, Keller A, Ludwig N, Meese E

9. Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Eckart Meese für die Überlassung des interessanten Themas sowie die Begutachtung meiner Dissertation. Für seine stete Diskussionsbereitschaft und sein offenes Ohr für Anliegen jedweder Art möchte ich ihm ebenfalls einen besonderen Dank aussprechen. In meiner fast fünfjährigen Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe hat er mir stets sein Vertrauen bei der Durchführung meiner experimentellen Arbeiten und Ideen entgegen gebracht.

Bei Herrn PD Dr. Yoo-Jin Kim aus dem Institut für Pathologie möchte ich mich recht herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation bedanken. Des Weiteren danke ich ihm für die durchgeführten Begutachtungen der Meningeom-Tumorproben, die im Rahmen meiner Experimente verwendet wurden.

Bei Herrn Prof. Dr. Joachim Oertel vom Institut für Neurochirurgie möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung der Meningeom-Tumorproben bedanken.

Ich bedanke mich bei Frau Ruth Nickels aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für die Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt Frau Dr. Nicole Ludwig für die gute Zusammenarbeit, die Durchsicht meiner Dissertation und ihre stete Gesprächsbereitschaft. Bei Problemen während der Durchführung meiner Experimente stand sie mir stets mit Diskussionsbereitschaft und Ratschlägen zur Seite. Bereits während meiner dieser Dissertation vorausgehenden Diplomarbeit am Institut für Humangenetik hat sie mir wertvolle Ratschläge mit auf den Weg gegeben.

Ein großer Dank gilt auch allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Humangenetik für viele hilfreiche Tipps und Gespräche. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Martin Hart und Herrn Dr. Christian Harz für ihre Ideen und Diskussionsbereitschaft, die zur erfolgreichen Durchführung meiner Experimente beigetragen haben. Weiterhin danke ich Frau Michele Bauer und Frau PD Dr. Ulrike Fischer für ihre Gesprächsbereitschaft und mentale Unterstützung.

Der größte Dank geht an meine Eltern und meine Familie, die mir das Studium und die Dissertation ermöglicht haben. Sie haben mich durch viele Höhen und Tiefen in dieser Zeit begleitet und mich stets unterstützt. Im Gedenken an meine Oma, die zwar den Beginn, jedoch leider nicht den Abschluss dieser Dissertation erleben konnte.